UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1969 — N° 589

APPORTS DES TESTS *IN VITRO* UTILISANT LES INDICATEURS NUCLÉAIRES DANS L'EXPLORATION DU MÉTABOLISME THYROÏDIEN

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(Mention UNIVERSITÉ)

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 1969

PAR

François ROUAIS

né à Caudéran (Gironde), le 2 février 1942

Examinateurs de la thèse :

MM. P. BLANQUET, Professeur ..... *Président*

J. MASQUELIER, Professeur ..... *Juges*

J. RIVIÈRE, Professeur ..... *Juges*

P. FERRET-BOUIN, Professeur ..... *Juges*

1969

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1969 — N° 589

APPORTS DES TESTS *IN VITRO* UTILISANT LES INDICATEURS NUCLÉAIRES DANS L'EXPLORATION DU MÉTABOLISME THYROÏDIEN

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(Mention UNIVERSITÉ)

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 1969

PAR

François ROUAIS

né à Caudéran (Gironde), le 2 février 1942

Examinateurs de la thèse :

MM. P. BLANQUET, Professeur ..... *Président*

J. MASQUELIER, Professeur ..... *Juges*

J. RIVIÈRE, Professeur ..... *Juges*

P. FERRET-BOUIN, Professeur ..... *Juges*

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MES MAÎTRES

D'innombrables recherches concernant le métabolisme thyroïdien ont été effectuées au moyen des isotopes de l'Iode. On aurait pu penser que le sujet s'épuisait quelque peu, les indicateurs nucléaires ayant été utilisés dès 1945 ; un maître éminent, spécialiste de ces questions ne déclarait-il d'ailleurs, en 1949, que "tout, presque tout avait été dit sur le métabolisme thyroïdien". Il n'en est heureusement rien et cette glande endocrine garde encore bien des secrets. D'intéressants sujets d'étude ont trait par exemple au mécanisme intime du contrôle hypothalamo-hypophysaire, à l'élaboration de cette nouvelle hormone : la thyrocalcitonine ; enfin, récemment apparaient différentes méthodes de détection et de dosage des hormones thyroïdiennes au moyen des isotopes utilisés "in vitro".

Rentré depuis plus de 4 ans dans le Laboratoire de Monsieur le Professeur P. BLANQUET, nous avons eu l'occasion de nous familiariser avec les différentes recherches qui y étaient effectuées.

Dès l'apparition de ces dosages "in vitro", il nous a été demandé de faire ce travail afin d'établir, si cela était possible, les normes qui les concernaient, en particulier celles relatives aux facteurs de Thyroxine Libre.

Nous n'aurions pu mener ces recherches à leur terme, sans les conseils de notre Maître, et sans la collaboration de toute son équipe. Que Monsieur le Professeur BLANQUET veuille bien trouver ici, l'expression de nos sentiments très reconnaissants et ses collaborateurs, au rang desquels, il faut citer M. DUCASSOU, qui s'est dépensé sans compter pour l'élaboration de cette thèse, l'assurance de nos sentiments très amicaux.

Mais ce travail eut été également impossible, sans la collaboration du Service de Monsieur le Professeur J. RIVIERE, dans lequel nous avons toujours trouvé le meilleur accueil. Que Monsieur le Professeur RIVIERE, qui a bien voulu accepter de nous juger, soit ici très vivement remercié.

Monsieur le Professeur P. FERRET-BOUIN avec sa bienveillance habituelle a consenti également à siéger dans notre Jury. Nous lui en exprimons notre gratitude.

Enfin, Monsieur le Professeur J. MASQUELIER, Président de l'U.E.R de Pharmacie, a bien voulu distraire quelques instants de ses nombreuses occupations pour venir très aimablement nous faire part de ses observations. Qu'il en soit ici très vivement remercié.

PLAN

	Pages
* AVANT PROPOS	1
* METHODES BASEES SUR L'EMPLOI des PROTEINES PORTEUSES	7
1) Test de saturation des protéines porteuses	9
2) Tests de fixation, in vitro, de T_3^*	9
3) Etude des différents tests proposés	11
Test TRIOSORB	15
- Principe	15
- Technique	16
* MESURE DE LA T_4 PLASMATIQUE TOTALE	18
Test TETRASORB	20
- Principe	20
- Technique	23
* MESURE DE LA T_4 PLASMATIQUE LIBRE	30
- Mesures directes	30
- Mesures indirectes	32
Facteur de Thyroxine libre	32
* RESULTATS	35
- Test "TRIOSORB"	35
- Test "TETRASORB"	42
- FACTEUR de THYROXINE LIBRE	47
Cas particuliers	52

* DISCUSSION 55

* CONCLUSION 59

* BIBLIOGRAPHIE

AVANT PROPOS

Les hormones élaborées par la glande thyroïde sont au nombre de deux : la tétraiodothyronine ou thyroxine (T_4) et la triiodothyronine (T_3). La thyroxine est l'hormone quantitativement la plus importante, puisqu'elle représente 90 à 95 % des hormones circulantes (38). Bien que certains effets métaboliques de la triiodothyronine soient plus marqués que ceux de la thyroxine, la concentration sérique de T_4 représente cependant le meilleur index de l'état thyroïdien.

En 1952, GORDON & Coll. (15) mirent en évidence par électrophorèse sur papier, l'existence de thyroxine au niveau des globulines (après incubation du sérum avec de la T_4 radioactive).

Sous l'appelation générale de "Thyroxine Binding Protein" (T.B.P.), RALL & ROBBINS (37, 42, 43) désignèrent en 1954 l'ensemble des protéines capables de fixer la thyroxine. En effet, si la thyroxine présente une affinité maximum pour une inter α_1 α_2-globuline (T.B.G.), elle peut aussi contracter des liaisons avec d'autres protéines, qui présentent pour elle des affinités décroissantes : une préalbumine T.B.P.A. "Thyroxine Binding Prealbumine" et l'albumine T.B.A. "Thyroxine Binding Albumine".

La répartition électrophorétique de l'hormone sur ces trois protéines est essentiellement fonction des conditions expérimentales : nature du tampon, pH, type d'électrophorèse.

On a pu montrer ainsi que :

- l'affinité de la thyroxine est maximum à l'égard de la T.B.G.

- la liaison hormone-protéine obéit à une réaction d'équilibre régie par la loi d'action de masse (45).

$$T_4 + T.B.P. \rightleftharpoons T.B.P. - T_4$$

$$[1] \qquad K = \frac{[T_4 - T.B.P]}{[T_4]\,[T.B.P]} \quad \text{avec } K = \text{Constante d'équilibre.}$$

Etant donné qu'il s'agit d'un équilibre :

- il existe dans le sérum une certaine quantité d'hormone libre (environ 0, 05 %) représentée dans l'expression [1] par $[T_4]$

- il existe une "capacité latente" de liaison de l'hormone vis à vis des protéines porteuses, représentée par $[T.B.P]$, $[T_4 - T.B.P]$ correspondant à la fraction hormonale liée aux protéines.

En fait, l'expression [1] est très générale, car chaque protéine possède sa propre constante d'équilibre. La valeur de chacune de ces constantes n'est pas actuellement connue de façon précise, étant donné qu'aucune de ces protéines porteuses n'a pu être obtenue à l'état pur. RALL (40) a cependant donné des valeurs approchées (Tableau n° 1).

TABLEAU n° 1

	K
T.B.G.	10^{10}
T.B.P.A.	10^{9}
T.B.A.	$1,6 \times 10^{6}$

Constante d'équilibre protéine - hormone exprimée en litre M^{-1}

La quantité d'hormone fixée par la protéine porteuse dépend non seulement de l'affinité de la thyroxine pour cette protéine, mais aussi du nombre de sites de cette dernière. En effet, les protéines porteuses possèdent une capacité vectrice limitée, celle-ci étant vraisemblablement fonction de leur propre concentration sérique. En conséquence, le taux de T_4 libre du sérum parait être en rapport avec la capacité de liaison de la T.B.P., et en définitive avec sa concentration sérique.

Un certain nombre de travaux ont été effectués pour apprécier l'importance de la T.B.P.A. ; on a montré qu'une variation de la concentration sérique de T.B.P.A. n'entrainerait pas de modifications notables de la thyroxine libre (53), mais que par contre, la concentration en T_4 libre était fonction de la capacité de liaison de la T.B.G. (3).

Le mode de liaison protéine-hormone serait, selon STERLING (51) du type électrostatique, l'association s'effectuant entre le groupe phénolique de la thyroxine et un radical NH_2 primaire de la protéine. TRITSCH (52) pense qu'il s'agit du groupe aminé terminal de l'acide aspartique.

LEMARCHAND BERAUD (26) en utilisant des inhibiteurs spécifiques des groupements sulfhydril et aminé ont confirmé ce mode d'association (qui serait également valable pour T_3 et T_4).

La capacité de fixation des protéines porteuses a été déterminée par différents auteurs. ROCHE & Coll. ont utilisé une méthode de saturation (chez des sujets normaux) (46). D'autre part, ROBBINS (45) ALBRIGHT (1) et DOWLING (9) ont fait des déterminations similaires. (Tableau n° 2).

	T.B.G.	T.B.P.A.	ALBUMINE
Quantité de T_4 fixée	17 à 20 µg pour 100 ml	100 à 200 µg pour 100 ml	150 mg pour 100 ml
	Selon ROBBINS, ALBRIGHT et DOWLING		
	20 à 22 µg pour 100 ml	120 à 150 µg pour 100 ml	
	Selon ROCHE & Coll.		

TABLEAU N° 2

La thyroxine libre présente dans le sérum semble jouer un rôle très important du point de vue métabolique. Seule cette fraction pénètrerait à l'intérieur des cellules réceptrices. Cette hypothèse émise en 1960 par RALL (45) a été reprise par de nombreux auteurs (21, 39, 41, 12).

Il a été, d'autre part, montré que la secrétion de T.S.H. au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire était contrôlée par le taux d'hormone libre circulante (45 - 21).

In vitro, la thyroxine exercerait une action complexe sur la respiration cellulaire, qu'elle activerait ou freinerait selon l'état thermodynamique mitochondrial (20).

Enfin, elle agirait également sur la biosynthèse de l'A. T. P. (forme de réserve de l'énergie libérée par la respiration cellulaire).

Conformément à l'hypothèse de RALL, la fraction liée aux protéines devrait donc être assimilée à une forme de réserve physiologiquement inactive, mais qui constituerait la plus importante des sources en T_4 libre, l'autre réserve étant représentée par le foie.

Le mécanisme de transport de la triiodothyronine est semblable à celui de la thyroxine. Toutefois, la T_3 ne se fixe pas sur la T. B. P. A (7). Elle se fixe essentiellement sur la T. B. G., mais avec une affinité trois fois moins grande que la T_4 (8), secondairement sur une α_2 et β-globuline, et également sur les hématies. Les sites de fixation sur les protéines porteuses seraient les mêmes pour T_3 et T_4.

D'après les derniers travaux effectués (13, 15), 99, 9 % de la T_4 serait liée aux protéines (environ 75 % sur la T. B. G., 15 % sur la T. B. P. A., et 10 % sur l'albumine).

Ces valeurs constituent uniquement un ordre de grandeur, car elles varient selon les conditions expérimentales.

* *
*

Pour apprécier l'état thyroïdien, plusieurs méthodes ont été utilisées Pendant longtemps, il a été fait appel à la mesure de l'iode protéique du sérum (Protein bound iodine ou P.B.I).

Cette méthode comporte trois temps principaux :

. précipitation des protéines plasmatiques par le sulfate de zinc ou l'acide trichloracétique.

. minéralisation du précipité.

. dosage de l'iode contenu dans le minéralisat : détermination colorimétrique basée sur la réduction du sulfate cérique (coloré) en sulfate céreux (incolore), en présence d'anhydride arsénieux, l'iode jouant le rôle de catalyseur, la vitesse de cette réaction et donc de la décoloration du milieu,est proportionnelle à la quantité d'iode présent.

Cette méthode longue, délicate, nécessite un appareillage complexe. (des résultats reproductibles n'étant en général obtenus qu'au moyen d'un appareillage automatique TECHNICON).

Depuis peu, il a été proposé des méthodes "in vitro" utilisant les isotopes radioactifs. Elles appartiennent à deux catégories :

- évaluation du nombre de sites des protéines plasmatiques (accepteurs d'hormones thyroïdiennes).
- dosage de la T_4 plasmatique.

METHODES BASEES SUR L'EMPLOI DES PROTEINES PORTEUSES

Elles concernent l'étude de ces protéines et la détermination du nombre de leurs sites accepteurs. Ceci à fait l'objet de nombreux travaux, car elles conduisent indirectement à la détermination de l'activité hormonale.

On peut parfaitement comprendre le mécanisme du phénomène lorsque l'on fait appel à une opération de saturation des protéines, et dans ces conditions tout est parfaitement clair. En effet, en imaginant une proteine porteuse ou un ensemble de protéines porteuses sur lesquelles se rencontrent des sites accepteurs d'hormones, un certain nombre de ces sites sont occupés par l'hormone endogène ; on saturera alors les sites restant au moyen d'hormone radioactive et on s'arrangera pour mettre en expérience un excès de cette dernière de telle façon qu'il existera dans le plasma une certaine quantité d'hormone radioactive libre qui n'aura pas trouvé de place sur les sites accepteurs. Le problème revient alors à déterminer le pourcentage d'hormone radioactive fixé sur les protéines porteuses et le pourcentage resté libre . :La séparation des deux fractions est relativement facile grâce à divers procédés analytiques.

Chez l'hyperthyroïdien le nombre des sites libres sur les protéines porteuses sera faible et par conséquent il existera peu de place vacante. Pour une quantité d'hormone radioactive ajoutée, on trouvera donc une grande concentration d'hormone radioactive libre.

Le phénomène inverse se rencontrera chez l'hypothyroïdien.

Par contre, les choses sont plus complexes lorsque au lieu d'effectuer une opération de saturation des protéines porteuses, on utilise

que de petites quantités d'hormones radioactives (radioactivité spécifique élevée). Dans ces conditions, un facteur primordial va intervenir : une réaction d'équilibre, qui par voie de conséquence, conduit à la notion de constante d'association.

Si l'on considère le problème posé par la thyroxine, la constante d'association du complexe protéine - hormone est relativement élevée, par conséquent la quantité de thyroxine fixée par les protéines porteuses va être grande et il existera une petite concentration de thyroxine libre. Etant donné les disparités entre T_4 libre et T_4 liée, il sera bien difficile d'aboutir à un résultat valable. Par contre, la constante d'association K du complexe protéine - T_3 est beaucoup moins élevée, c'est-à-dire qu'il ne se fixera sur la protéine porteuse qu'une quantité d'hormone radioactive (T_3) très inférieure au cas précédent, mais par voie de conséquence, la quantité de T_3 restée libre sera beaucoup plus grande et une appréciation correcte de chacune de ces concentrations pourra être effectuée.

Par les tests de fixation de la T_3 qui représentent en quelque sorte un "stratagème", on pourra évaluer la capacité latente de fixation pour la T_4 ou du moins l'obtenir à un facteur constant près puisque les sites de situations de T_4 et T_3 sont les mêmes.

Précisons en terminant qu'il s'agit là toujours de réactions d'équilibres qui sont par conséquent soumises à la température, ce qui implique que dans tous ces tests il sera nécessaire de contrôler rigoureusement la température pendant l'expérience.

1) Test de saturation des protéines porteuses.

Ce test est réalisé par saturation de la T.B.G. et de la T.B.P.A. au moyen d'une solution de thyroxine, dont on connait la concentration, et à laquelle on a également ajouté une dose traçeuse de T_4 radioactive. L'albumine n'intervient pas dans ce type d'expérience, étant donné sa faible constante d'équilibre, en conséquence une grande quantité de T_4 serait nécessaire pour la saturer.

Après incubation du mélange : sérum - T_4^* on sépare électivement par électrophorèse la T.B.G. et la T.B.P.A.. De la mesure de la radioactivité de ces deux fractions, on déduit la capacité des sites accepteurs de la T.B.G. et de la T.B.P.A. (45 - 1 - 9). Les résultats obtenus chez le sujet normal sont rapportés sur la figure n° 1.

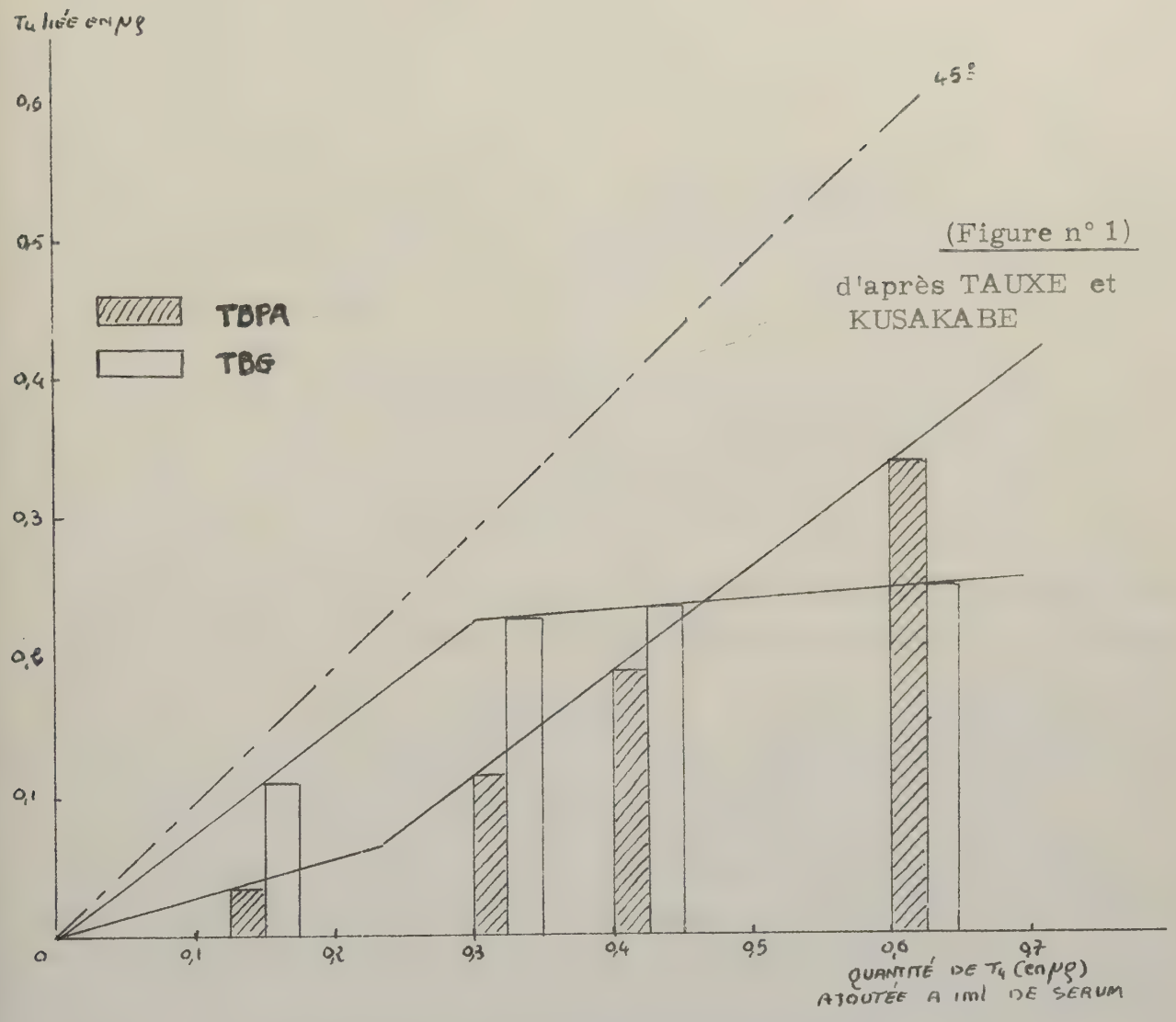
Il résulte de cette figure que l'addition de 0,24 μg de T_4 à 1 ml de sérum suffit à saturer la T.B.G.

Chez l'hypothyroïdien, les courbes obtenues sont similaires, mais dans ce cas 0,38μg de T_4 sont nécessaires pour saturer la T.B.G. contenue dans 1 ml de sérum. A l'opposé, il faut 0,17 μg de T_4/ml de sérum chez un sujet atteint d'hyperthyroïdie pour saturer cette protéine.

2) Tests de fixation in vitro de T_3^*

Ils évaluent la capacité latente de fixation de la T.B.G. pour T_3 (cette hormone ne se fixant pas sur la T.B.P.A.)

T_3 et T_4 possédant les mêmes sites de fixation sur les protéines porteuses, ces tests permettent de déduire la quantité de T_4 véhiculée par



(Figure n° 1)

d'après TAUXE et KUSAKABE

FIXATION DE T_4^* sur les PROTEINES PORTEUSES

LORSQUE L'HORMONE EST AJOUTEE AU SERUM D'UN SUJET NORMAL A DOSES CROISSANTES.

la T.B.G.

En conséquence, le taux de T_3 fixée sur la T.B.G. sera inversement proportionnel à la concentration de T_4 endogène fixée sur cette même protéine.

Cette fixation dépend :

- du nombre de sites libres de la T.B.G.
- du taux de thyroxine sérique.
- de la quantité de T.B.G.

Comme la concentration en T.B.G. est relativement stable chez l'homme, la fixation de T_3 reflètera la fixation de T_4 endogène.

Dans les différents tests, on mesure en pourcentage le taux de T_3 qui n'a pas été fixé par la protéine porteuse. Le résultat obtenu est alors directement proportionnel au taux de T_4 fixée.

Toutes les méthodes décrites pour la détermination du taux de T_3 libre reposent sur ce même principe général.

3) Etude des différents tests proposés.

HAMOLSKY en 1957 (16 - 17 - 18 - 19) a été le premier a proposé un test de fixation de T_3 in vitro. La séparation de la T_3 demeurée libre étant réalisée par sa fixation sur les hématies.

La mesure de la radioactivité des globules rouges permet donc de déterminer le taux de T_4 endogène fixé sur la T.B.G.

Les conditions de l'incubation rendent cette méthode longue et délicate ; de plus, une perturbation de l'équilibre globules rouges - T_3

peut entraîner une variation des résultats.

Plus récemment, on a eu l'idée de remplacer, pour fixer la T_3 demeurée libre, les globules rouges par des résines échangeuses d'ions. Cette méthode simplifie le mode opératoire et améliore la reproductibilité.

Par contre, le principe est légèrement différent. Dans le test d'HAMOLSKY, l'équilibre :

$$\text{globules rouges} + T_3 \rightleftharpoons \text{globules rouges} - T_3$$

est atteint à la fin de l'incubation. Dans le test utilisant les résines échangeuses d'ions, l'équilibre :

$$\text{résine} + T_3 \rightleftharpoons \text{résine} - T_3$$

n'est jamais atteint (13). Ce test mesure alors la vitesse de fixation de la T_3 sur la résine, cette vitesse étant d'autant plus grande que la concentration en T_4 est plus importante.

Aussi le temps d'incubation revêt-il ici une grande importance.

Les résines peuvent être utilisées en colonnes ou en "batch", ou incorporées dans une éponge. (29 - 49 - 54 - 5). On obtient ainsi une bonne reproductibilité, si l'on respecte exactement les conditions d'incubation.

Certains auteurs utilisent pour séparer T_3^* libre de T_3^* liée, le SEPHADEX (47 - 7)

La T_3^* liée aux protéines est retenue sur une colonne de SEPHADEX G 25. La radioactivité de la colonne permet de déduire la fraction de T_3 liée aux protéines. Cette méthode n'entraine que peu

de perturbations au niveau de l'équilibre protéine-T_3.

GARNETT & Coll. (11) séparent la T_3 libre de la T_3 liée par dialyse et ultrafiltration, à l'aide d'un appareil TECHNICON.

Par ces différentes techniques chez l'individu normal, on obtient en moyenne un pourcentage de fixation de T_3 compris entre 23 et 32 %.

Ce type de test est de plus en plus utilisé pour l'exploration fonctionnelle de la thyroïde, car il présente de nombreux avantages :

- suppression de l'administration de radioactivité au malade.
- la présence du malade n'est plus nécessaire au laboratoire.
- la précision fournie est égale ou même supérieure à celle des autres méthodes d'étude.

Ces tests peuvent être utilisés dans des circonstances où les autres méthodes ne peuvent être appliquées : enfants, femmes enceintes, saturation iodée de l'organisme etc....

En raison de ces avantages, un certain nombre de variantes, simples d'execution, ont été mises au point, ce qui les rend particulièrement accessibles aux Laboratoires d'analyses, en vue d'une utilisation en routine.

Les tests "T_3" utilisés à l'heure actuelle sont assez nombreux mais leur principe reste toujours le même, en ce sens que l'on fixe la fraction T_3^* libre sur un matériel convenable.

Dans le cas du test original de HAMOLSKY (18), la T_3 restée libre sera fixée par les hématies.

Mais ce matériel étant délicat à manipuler dans des conditions absolument reproductibles, on a fait appel à des supports inertes comme les résines échangeuses d'ions avec de petites différences expérimentales dans la procédure : résine préalablement marquée au moyen de $T_3{}^{125}I$ que l'on met en contact avec le sérum à tester (MALLINCKRODT - T.B.I) ; la manipulation étant effectuée en "batch", ou bien, on peut encore déposer la résine dans une colonne à travers laquelle, on fait passer l'ensemble T_3^* - sérum. (TRESITOPE - SQUIBB). Enfin, un procédé plus original consiste à inclure la résine dans une éponge polyuréthane que l'on met en contact avec l'ensemble Sérum - T_3^* (TRIOSORB - ABBOTT).

On peut encore fixer la fraction T_3^* restée libre sur d'autres types de supports comme le charbon, recouvert d'une couche très fine de protéines (NEN - PICKER).

Tout dernièrement est apparue une nouvelle méthode faisant appel au SEPHADEX, qui fixe sélectivement la fraction liée (THYOPAC - 3 - AMERSHAM).

Pour les tests mettant en jeu les résines, le temps d'incubation et surtout la température doivent être rigoureusement codifiés. Par contre, pour le test charbon-protéine ainsi que pour le THYOPAC - 3, ces conditions sont beaucoup moins critiques.

Tous ces tests donnent des résultats de précision équivalente, l'un est peut-être un peu plus long ; l'autre fournit une meilleure géométrie de comptage, mais les différences dans la qualité des résultats sont très peu sensibles. En ce qui nous concerne, pour des raisons de commodité d'emploi et notamment de rapidité d'exécution, nous avons choisi le test TRIOSORB au moyen duquel toutes nos déterminations ont été effectuées.

TEST TRIOSORB

Principe :

Ce test découle directement de la méthode décrite par MITCHELL (29). Son originalité réside dans l'emploi d'une éponge-résine, qui prend la place des globules rouges de la méthode de HAMOLSKY. C'est une éponge en polyurethane dans laquelle a été incorporée une résine échangeuse d'anions, à grains de très petit diamètre.

"L'éponge résine" présente plusieurs avantages :

- deux ou trois rinçages suffisent à éliminer la totalité de la radioactivité non fixée par la résine (pour les globules rouges, il était nécessaire d'effectuer de nombreux lavages, et malgré cela, les résultats obtenus n'étaient pas toujours homogènes).

- le sérum peut être conservé pendant plusieurs jours à basse température, ce qui permet le stockage d'un grand nombre d'échantillons et la possibilité d'effectuer un ensemble d'analyses en une seule opération.

Le mécanisme de ce test est plus complexe que celui des tests de saturation ou du test de HAMOLSKY. En effet, dans le cas du système constitué par le sérum du sujet, la T_3 radioactive et la résine échangeuse d'ions, l'équilibre n'est jamais atteint, ce qui implique l'obligation de fixer une fois pour toute le temps d'incubation. En réalité, il existe une compétition pour la T_3 entre la protéine porteuse d'une part, et la résine d'autre part. Les protéines porteuses attirant T_3^* avec une force F_1 et la résine avec une force F_2. F_2 étant toujours supérieur à F_1 ; mais F_1

est fonction de la "capacité latente" de fixation des protéines porteuses :

- F_1 sera très importante dans le cas de l'hypothyroïdie, et faible dans l'hyperthyroïdie, ce qui se traduira par une fixation élevée sur la résine pour l'hyperthyroïdie et faible pour l'hypothyroïdie.

Donc, en résumé, la fixation sur l'éponge-résine augmente da dans l'hyperthyroïdie et diminue dans l'hypothyroïdie.

Technique

Le test TRIOSORB 125 est livré prêt à l'emploi ; il comporte :

- des seringues contenant 0,1 μCi de triiodothyronine marquée à l'Iode 125.
- des éponges résines.
- des tubes et agitateurs.

On effectue le dosage à partir d'une prise de sang de 6 ml. Après coagulation et centrifugation, on prélève 1 ml du sérum auquel on ajoute le contenu de la seringue. Sans attendre, on introduit dans le milieu l'éponge-résine. On laisse incuber à température ambiante, pendant une heure (la fixation dépendant de la température.) Une correction doit être effectuée si la température est différente de 25°C.

En cours d'incubation, on mesure la radioactivité (généralement pendant une minute, à l'aide d'un compteur-puits). A la fin de l'incubation, on aspire le contenu du tube, après avoir exprimé l'éponge, on lave trois fois cette éponge avec 5 ml d'eau distillée.

On détermine ensuite la radioactivité retenue par l'éponge (correspondant à la radioactivité de T_3 fixée par la résine).

Le pourcentage de triiodothyronine fixée est alors obtenu :

$$\frac{\text{Imp/min. (2° comptage)}}{\text{Imp/min. (1° comptage)}} \times 100 = \% \text{ de } T_3 \, {}^{125}I \text{ fixé par la résine.}$$

Les valeurs trouvées sont : 25 à 35 % chez le sujet euthyroïdien.

On doit remarquer que le pourcentage de fixation de la T_3 dépend directement de la concentration de la T.B.G. circulante. Aussi, toute variation de cette concentration produira une variation du taux de fixation de T_3.

Par exemple, au cours de la grossesse, il se produit une augmentation des protéines plasmatiques, sous l'influence du taux élevé d'œstrogènes, ce qui provoque une augmentation de la fixation de T_3 sur les protéines porteuses, sans cependant qu'il existe un désordre thyroïdien quelconque.

Par contre, si au cours de certains états pathologiques, il se produit une variation de concentration de T.B.P.A., il est bien évident que la T_3 ne se fixant pas sur la T.B.P.A., le test pourra refléter cette variation.

MESURE DE LA T_4 PLASMATIQUE TOTALE

L'intérêt concernant la mesure directe de l'hormone libérée par la thyroïde, sous forme de thyroxine libre a toujours été important. Etant donné sa faible concentration dans le sérum : 0, 05 % environ de la thyroxine totale, elle est très difficile à mesurer. (23)

Par contre, la thyroxine totale : (somme de la T_4 libre et de la T_4 liée aux protéines) est plus facile à doser. Sa concentration est obtenue par extraction de l'hormone après précipitation préalable des protéines sériques.

EKINS (1960) (10) fut le premier à effectuer cette détermination en utilisant le principe de fixation compétitive sur les protéines. On se base sur le fait que la protéine porteuse peut s'associer à une thyroxine endogène ou exogène. Ces deux "thyroxines" entrent en compétition pour se lier aux sites de la protéine porteuse, jusqu'à ce qu'un équilibre soit établi. On peut schématiser ainsi le phénomène.:

$$\text{T.B.P.} - (x\,\%\ T_4 + Y\,\%\ T'_4) \rightleftarrows \text{T.B.P.} + (100\text{-}x\,\%)\ T_4 + (100 - Y\%)T'_4$$

avec T_4 thyroxine endogène (non marquée)
et T'_4 thyroxine exogène (radioactive).

Dans sa méthode, EKINS effectue une extraction du sérum au butanol. Il étudie par électrophorèse le transfert d'une dose traceuse de T_4^* des globulines aux albumines, par addition de T_4^* exogène à doses croissantes. Le résultat obtenu avec la thyroxine endogène (extraite du sérum) est comparé à cet étalonnage initial.

Basé sur le même principe, MURPHY & PATTE (30) ont développé une méthode plus rapide pour déterminer la thyroxine totale du sérum.

Ils font une extraction à l'alcool. Le taux de thyroxine est ensuite évalué par déplacement d'une T_4 radioactive fixée sur les protéines, au moyen de la T_4 du sérum, à travers une colonne de gel filtrant, qui retient la thyroxine non liée.

Dans une publication récente, MURPHY et JACHAN (31) ont remplacé le gel filtrant par une résine échangeuse d'ions.

NAKAJIMA & Coll. (32) KAPLAN (24) KENNEDY et ABELSON (25) utilisent le principe de l'analyse par saturation pour mesurer la thyroxine totale. Ils emploient une "éponge résine" pour séparer la thyroxine liée de la thyroxine libre.

KAPLAN utilise la thyroxine marquée à l'Iode 125 et montre que l'on peut fixer d'avance cette T_4^* à la T.B.G.

Ainsi le complexe T.B.G. - T_4^* devient un réactif satisfaisant pour mesurer le taux de thyroxine totale du sérum.

Il est intéressant de noter que toutes ces méthodes sont indépendantes des interférences provoquées par l'existence dans le milieu réactionnel d'éléments iodés, autres qu'hormonaux.

En raison de sa période, l'iode 125 permet une plus grande autonomie. En effet, celui-ci a une demi-vie de 60 jours, alors que celle de l'Iode 131 est de 8,1 jours seulement.

TEST TETRASORB

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé le test "TETRASORB" (Laboratoires ABBOTT) qui met en jeu la méthode de KAPLAN.

Principe :

Deux considérations sont importantes :

- le recyclage ou "turn over" de la thyroxine sérique s'effectue lentement.

- la T.B.G. ne différencie pas la thyroxine marquée de la thyroxine non marquée.

Nous avons vu que la thyroxine s'associe au moins à trois protéines. Elle se fixe en majeure partie à une inter α_1-α_2 globuline (T.B.G.), secondairement à une préalbumine (T.B.P.A.) et à un taux relativement faible à l'albumine.

Il a été établi que la capacité maximum correspond approximativement à 20 µg de thyroxine/100 ml de sérum (22). Comme il existe seulement une faible concentration de T.B.G. dans le sérum, les sites accepteurs sont facilement saturés par une petite quantité de T_4. Si l'on ajoute en même temps de la T_4 ^{125}I comme traceur, la concentration de T_4 liée aux protéines va pouvoir être déterminée. En effet, à mesure que l'on ajoute de la T_4 non marquée au système, la quantité de thyroxine ^{125}I liée aux protéines va diminuer, puisque les thyroxines marquée et non marquée rentrent en compétition pour les mêmes sites.

Lorsque l'équilibre est atteint, l'éponge-résine permet la séparation de la T_4 liée à la T.B.G. de la T_4 libre.

Ainsi, on peut construire une courbe standard, avec différentes solutions étalons de T_4. (Fig. n° 2).

Si maintenant au lieu de solutions étalons de T_4 on met en présence du même système la thyroxine extraite d'un sérum X, on pourra évidemment, en se reportant à la courbe standard, déterminer la concentration de thyroxine du sérum en expérience.

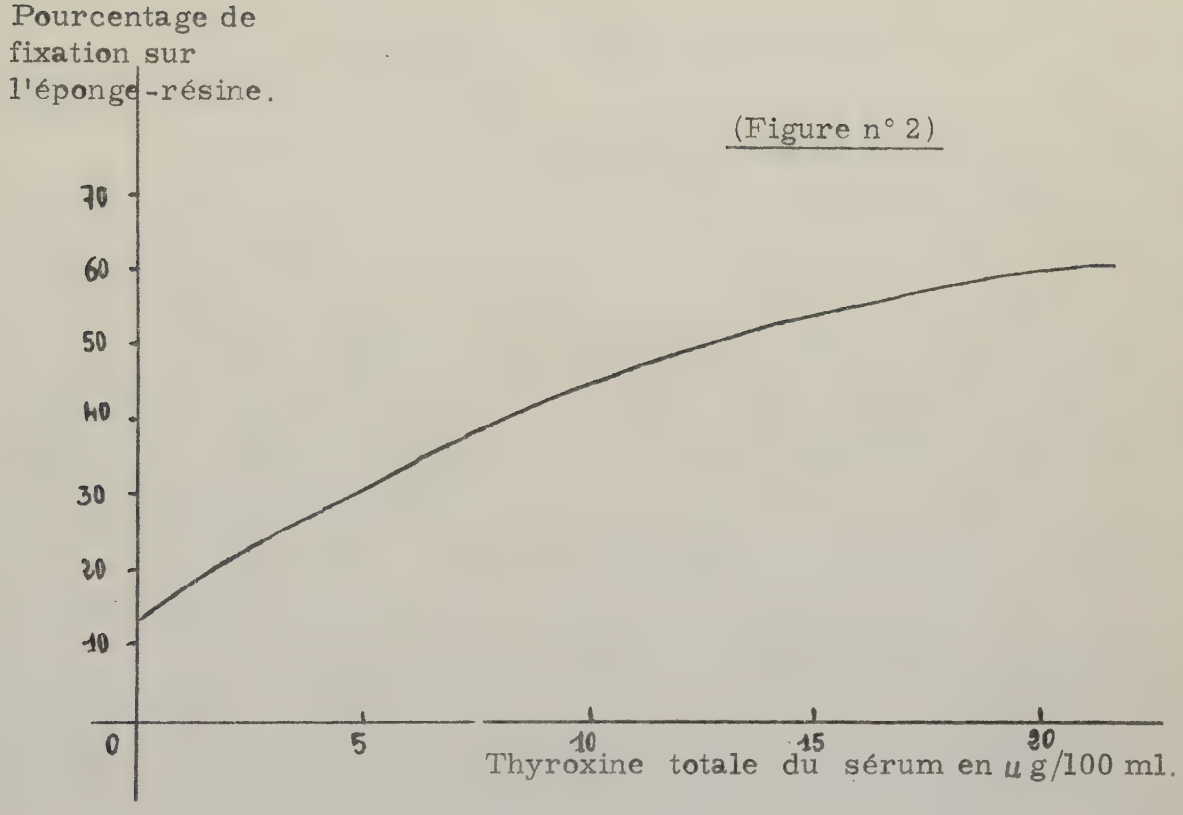
Cette méthode de détermination de la concentration totale de T_4 sérique est basée sur la compétition "in vitro" qui se produit entre la thyroxine non marquée d'une part, et la thyroxine ^{125}I vis à vis des sites accepteurs de la T.B.G. d'autre part ; la résine constituant un ensemble de sites secondaires pour la thyroxine non liée. On mesure ainsi la vitesse avec laquelle la thyroxine devient "irréversiblement" liée à l'éponge résine.

En raison du phénomène envisagé, un contrôle précis de la température et du temps d'incubation est essentiel.

En conclusion, le mécanisme de ce dosage peut être interprété de la façon suivante :

1°) - La protéine porteuse : T.B.G. est isolée, saturée par T_4 et marquée par T_4 ^{125}I (dose traceuse).

2°) - Les standards de T_4 sont mis en présence de cette T.B.G. Dans ces conditions, deux phénomènes fondamentaux vont se produire durant l'incubation.



(Figure n° 2)

COURBE STANDARD.

a) Les thyroxines quelles qu'elles soient vont se répartir entre la T.B.G. d'une part et la résine d'autre part, puisqu'il y a compétition entre ces deux systèmes qui attirent ces hormones avec des forces différentes.

b) Il va se produire un échange entre la T_4 ^{125}I et la T_4 non marquée (endogène ou standard).

Ces deux phénomènes vont évoluer simultanément pendant toute l'incubation dont la durée est la même, qu'il s'agisse de solution standard (courbe d'étalonnage) ou de sérum

Par conséquent, si l'on suppose que l'évolution de ces deux phénomènes est la même pendant le temps d'incubation fixée, ou pourra déduire des indications données par la courbe standard, une détermination de la T_4 d'un sérum inconnu.

A/ Technique

La réalisation de ce dosage s'effectue à partir de l'ensemble suivant :

- seringues contenant le complexe T.B.G. - T_4^* ^{125}I.
- éponges (polyuréthane) dans lesquelles a été incluse, au cours de la synthèse, une résine échangeuse d'ions.
- agitateurs et tubes.

Le mode opératoire peut être résumé ainsi :

- On mélange 1 ml du sérum du malade avec 2 ml d'éthanol, afin de précipiter les protéines et d'extraire la thyroxine.

- On centrifuge et on évapore 1 ml du mélange.
- Le résidu est dissout au moyen de 1 ml du complexe T.B.G. - $[T_4 - T_4^{*\ 125}I]$ (contenu dans la seringue).
- On introduit l'éponge résine dans le mélange et on laisse incuber à 0°, au bain marie, pendant 1 heure.

Au cours de cette incubation, la T_4 de l'échantillon (sérum ou standard) entre en compétition avec la $T_4^{*\ 125}I$ pour les sites de liaison de la T.B.G. La thyroxine non liée se fixe sur la résine échangeuse d'ions avec une vitesse proportionnelle à la concentration de T_4 du sérum.

- On détermine la radioactivité initiale du mélange après 30 minutes d'incubation.
- Ensuite, on lave l'éponge résine.
- On compte la radioactivité de l'éponge qui correspond à la fraction de thyroxine libre.

Pour connaître le pourcentage de fixation, on calcule le rapport suivant :

$$\frac{\text{imp/min. correspondant à la radioactivité de l'éponge}}{\text{imp/min. initiale.}} \times 100 = \text{Pourcentage de fixation}$$

Pour obtenir la concentration du sérum en µg/ml, on se reporte à la courbe étalon déterminée préalablement.

Ce test est d'une réalisation simple et rapide. Il présente une excellente reproductibilité. A titre d'exemple, (Cf le tableau ci-dessous) (dosages en double). (2)

TABLEAU N° 3

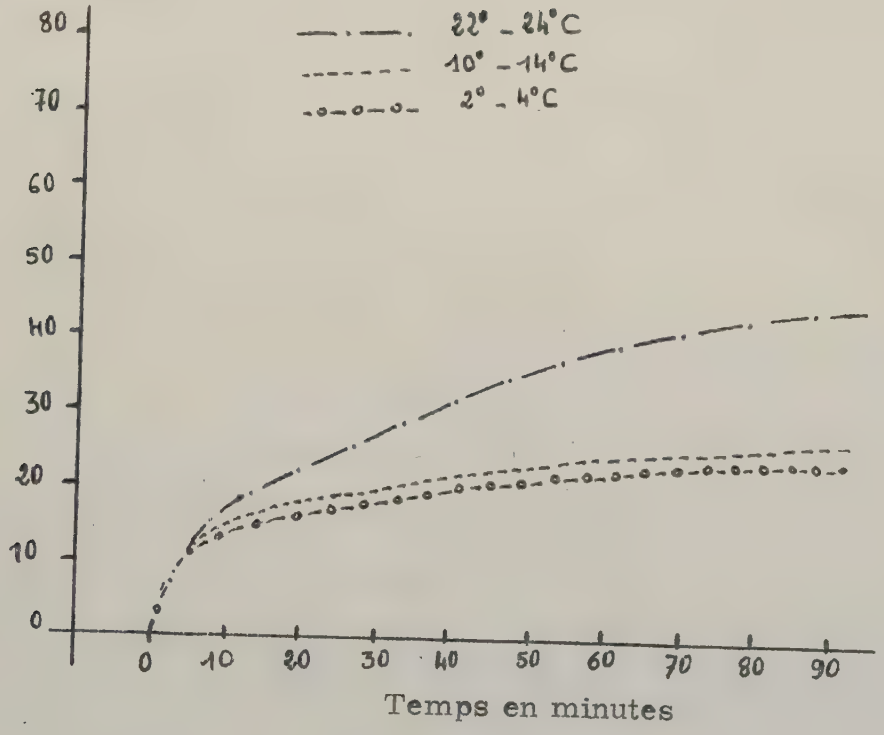
Sérum n°1	Sérum n° 2	Sérum n° 3	Sérum n° 4	Sérum n° 5
T_4 en µg/100 ml				
7,7 7,2	6,3 7	3 3,1	12,5 12,4	18 18,2

Pour obtenir une précision de cet ordre, il y a lieu de respecter rigoureusement quatre facteurs qui peuvent faire varier les résultats le temps d'incubation, la courbe étalon, la température et le coefficient d'extraction de T_4 à partir du sérum.

- La vitesse avec laquelle l'hormone se fixe sur la protéine augmente lorsque la température diminue. Aussi doit-on vérifier que l'incubation est toujours effectuée à une température constante. (Fig. 3)

FIXATION SUR L'EPONGE-RESINE EN FONCTION de la TEMPERATURE.

(Figure n° 3)



Sur cette courbe, nous constatons que les différences de fixation sont plus importantes entre 22° et 10° qu'entre 2° et 10°.

En conséquence, il semble nécessaire que la température d'expérience soit fixée aux environs de 2°C.

L'équilibre protéine-hormone s'établit au cours du temps, selon une courbe reproduite dans la figure n° 4 .

D'après celle-ci, on s'aperçoit que la fixation augmente progressivement de 0,33 %/minute de la 40ème à la 70ème minute. Puis, il existe un semi-palier, où l'équilibre semble se stabiliser. Le temps adéquate semble se situer autour de 60 minutes. Chaque Laboratoire peut adopter ses propres conditions, mais il est bien évident que, pour obtenir une reproductibilité satisfaisante, il est indispensable d'expérimenter toujours avec le même temps d'incubation (de l'ordre d'une heure).

Une autre cause d'erreur est l'évaluation du coefficient d'extraction de la T_4 par les solvants. En effet, il est rare qu'un solvant ait un rendement de 100 %. Aussi faut-il mesurer ce coefficient d'extraction pour chaque série de déterminations.

Ce coefficient d'extraction peut également être variable en fonction du temps.

Nous avons employé l'éthanol à 95 % (coefficient d'extraction de 79 %.)

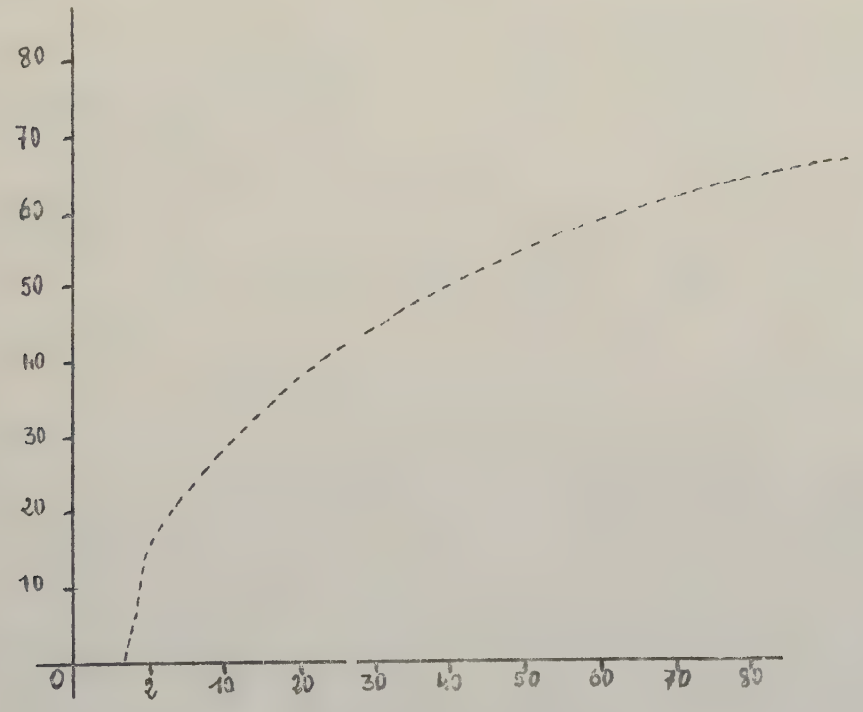
Les résultats sont ensuite confrontés avec la courbe étalon.

FIXATION SUR L'EPONGE RESINE

EN FONCTION DU TEMPS.

Pourcentage de fixation
sur l'éponge-résine.
incubation à 0 - 1°C

(Figure n°



Temps en minutes.

Pour éviter toute fausse interprétation, on doit s'assurer que les résultats obtenus au Laboratoire correspondent avec la courbe livrée avec les réactifs. Pour cela, on effectue une série de témoins, avec des solutions étalons.

Tous les facteurs précédents sont très importants pour réaliser une série de dosages de bonne reproductibilité. Pratiqué soigneusement, le test "TETRASORB" semble être un excellent index de l'état thyroïdien. Les nombreux dosages que nous avons effectués ont été en effet le plus souvent en étroit accord avec le diagnostic clinique.

Les résultats sont en fin de compte exprimés en µg d'iode /100 ml de sérum.

On détermine tout d'abord :

$$\text{le pourcentage de fixation de la résine} = \frac{\text{Radioactivité de l'éponge}}{\text{Radioactivité initiale.}} \times 100$$

On reporte ensuite ce pourcentage sur la courbe standard, ce qui correspond à x µg/100 ml, que l'on divise par le coefficient d'extraction de T_4, déterminé pour le solvant considéré. Si l'on veut exprimer ces résultats en ^{127}I, il faudra multiplier la concentration de T_4 obtenue (en µg/100 ml) par 0,653. 0,653 correspondant au pourcentage d'iode contenu dans une mole de thyroxine.

MESURE DE LA T_4 PLASMATIQUE LIBRE.

Mesures directes :

La thyroxine libre du sérum représenterait la forme active de l'hormone. Il serait donc intéressant de connaître sa concentration plasmatique et tissulaire. Ainsi, on pourrait peut être se faire une idée particulièrement précise de l'activité thyroïdienne.

La principale difficulté de ce dosage est inhérente à la très faible concentration de la thyroxine libre (0, 05 % environ de la T_4 totale). Ces dernières années, différents auteurs ont proposé certaines méthodes de dosage, qui sont essentiellement basées sur la dialyse d'un échantillon de sérum auquel on a ajouté une dose traceuse de T_4^* (4).

La concentration de la thyroxine radioactive, qui a dialysé en 24 heures est proportionnelle à la concentration de T_4 libre dans le sérum.

La T_4 libre (ou P.F. T_4 : Percentage Free Thyroxine) reflète assez bien l'état thyroïdien, car sa valeur est généralement abaissée dans d'hypothyroïdie et élevée dans l'hyperthyroïdie.

Cependant, dans certains cas, la corrélation entre (P.F.T_4) et le diagnostic clinique n'existe plus, cette valeur ne tenant aucun compte de la concentration de la thyroxine totale.

Aussi a-t-on remédié à cette cause d'erreur en déterminant la concentration absolue de la T_4 libre (A.F.T_4 : Absolute Free Thyroxine), cette valeur représentant le produit de la concentration totale de T_4 par celle de T_4 libre.

La concentration absolue de thyroxine libre (A.F.T_4) fournirait un reflet plus exact de l'état thyroïdien que celui donné par T_4 libre (P.F.T_4).

Différentes méthodes ont été décrites pour effectuer le dosage de la thyroxine libre. Elles diffèrent par le mode de purification de la T_4 dialysée. En effet, dans le dialysat, se trouve la T_4 radioactive et des contaminants comme l'iodure 125 ou 131.

Pour séparer l'hormone de l'iodure, STERLING et HEGEDUS (50) utilisent une colonne de résine échangeuse d'anions.

OPPENHEIMER & Coll. (34) emploient pour la dialyse un système comportant des protéines. La thyroxine radioactive est alors séparée, en précipitant les protéines par l'acide trichloracétique. On obtient ainsi une relation linéaire entre la quantité de protéines ajoutées et la concentration en thyroxine libre.

Une méthode plus récente (27-28)utilise les propriétés d'exclusion des gels pour séparer T_4^* libre et l'iode minéral.

Après la dialyse, on fait donc passer le dialysat sur une colonne de SEPHADEX G.25. L'iode est éluée par l'eau. Puis, dans un deuxième temps, on élue la colonne au moyen d'un sérum normal qui entraine la thyroxine adsorbée par le gel.

Cette méthode est la plus simple des méthodes décrites et semble être promise à un certain avenir dans le cadre des techniques de routine.

Mesures indirectes

Il est parfaitement possible de calculer un facteur de thyroxine libre, proportionnel à la concentration de T_4 libre, (exprimé en unités arbitraires).

Facteur de thyroxine libre.

Nous avons vu précédemment que la liaison hormones - protéines s'effectue selon une réaction d'équilibre obéissant à la loi d'action de masse (45).

$$K = \frac{[T_4 - T.B.G.]}{[T_4][T.B.G.]}$$

$[T_4 - T.B.G.]$ peut être considéré comme la fraction hormonale liée aux protéines, donc équivalente à la concentration de thyroxine totale sérique. On commet certes une légère erreur puisque la thyroxine libre ne représente que 0,05 % de la T_4 totale..

$[T.B.G.]$ représente la capacité latente de liaison de la thyroxine sur la protéine qui est évaluée par le test de fixation de T_3^*

$[T_4]$ correspond à la thyroxine libre.

On peut donc écrire :

$$[1] \quad K[T_4] = \frac{[T_4 - T.B.G.]}{[T.B.G.]} = \frac{\text{thyroxine totale sérique}}{\text{capacité latente de fixation de la T.B.G.}}$$

La capacité latente de fixation de la T.B.G. libre est inversement proportionnelle à la fixation de T_3 dans les tests classiques.

Le premier index de thyroxine libre (CLARK & Coll) (6) et OSORIO & Coll. (35 - 36) correspondait à :

F.T.L. (Facteur de Thyroxine Libre) = test de fixation de T_3 x dosage de la T_4 totale

Le dosage de la T_4 était à l'époque effectué par la méthode du P.B.I. 127, et certainement des erreurs pouvaient être commises en raison de l'interférence des apports d'iode exogène.

Cependant, malgré ses insuffisances, cette méthode a donné de bons résultats dans le diagnostic des différents etats thyroïdiens (ex : cas de grossesses ou femmes utilisant les contraceptifs oraux (14).

En ce qui nous concerne, nous avons utilisé pour T_3 le test TRIOSORB, et comme dosage de la T_4 totale le test TETRASORB. Avec ce dernier, nous obtenons des résultats beaucoup plus cohérents, puisque pratiquement jamais ces déterminations ne sont affectées par les apports d'iode exogène.

Pour déterminer K $\left[T_4\right]$ selon la formule $\left[1\right]$, nous avons utilisé comme valeur de $\left[T.B.G.\right]$ le rapport $\frac{x}{m}$

x : étant le résultat du test TRIOSORB dans le cas considéré.

et m: étant la valeur moyenne, obtenue chez un grand nombre d'individus normaux m = 32 %.

$\left[T_4 - T.B.G.\right]$ correspond, par ailleurs, aux résultats trouvés pour le test TETRASORB exprimé en µg de ^{127}I / 100 ml.

Soit : T_4 = µg de T_4 x 0,653.

En résumé, le facteur de T_4 libre s'exprime par :

$$\text{F.T.L. (Facteur de Thyroxine Libre)} = \frac{x}{m} \times \mu g\, T_4 \times 0,653.$$

RESULTATS

- Test "TRIOSORB"

Nous avons effectué le test TRIOSORB sur 206 cas, et classé les sujets en trois catégories : hypothyroïdiens (20 cas), hyperthyroïdiens (82 cas) et euthyroïdiens (104 cas). Ce classement a été fait d'après le diagnostic clinique de chaque malade et confirmé par les tests dynamiques à l'Iode 131.

Parmi les euthyroïdiens (104 cas), nous devons signaler que 80 % étaient des sujets bien portants, alors que 20 % souffraient de troubles organiques mineurs, d'origine extra thyroïdienne. D'autre part, aucun de nos patients n'a été traité avant que nous ayons effectué le dosage.

Enfin, nous avons enregistré tous les résultats sans exception (pas d'élimination des cas qui pouvaient nous paraître immédiatement aberrants). Toutefois, les malades présentant une anomalie au niveau des protéines porteuses ont été examinés séparément.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Sujets Hypothyroïdiens

La moyenne du taux de fixation de T_3^* est de 23,6 % avec un écart-type de $\pm$ 3,8 %.

Les valeurs inférieures à 27,4 % de fixation de T_3^* sur l'éponge résine peuvent être considérées comme représentant une zone de présomp-

tion hypothyroïdienne, étant donné le chevauchement des zones euthyroïdiennes et hypothyroïdiennes. (Fig. 5)

Les valeurs comprises entre 27, 4 % et 29, 4 % sont considérées comme valeurs incertaines.

En tenant compte des données précédentes, nous avons recensé :

- 17 cas hypothyroïdiens, avec une probabilité de 100 %
- 1 cas hypothyroïdien, classé dans la zone incertaine.
- 2 cas hypothyroïdiens, classés dans la zone euthyroïdienne.

Sujets Euthyroïdiens

La moyenne du taux de fixation de T_3^* est de 32, 0 % avec un écart-type de $\pm$ 2, 6 %

La zone où l'on peut considérer un sujet euthyroïdien, avec une probabilité de 100 % est comprise entre 29, 4 % et 34, 6 %.

Deux zones incertaines 27, 4 % - 29, 4 % et 34, 6 % - 40, 5 % entourent la zone euthyroïdienne.

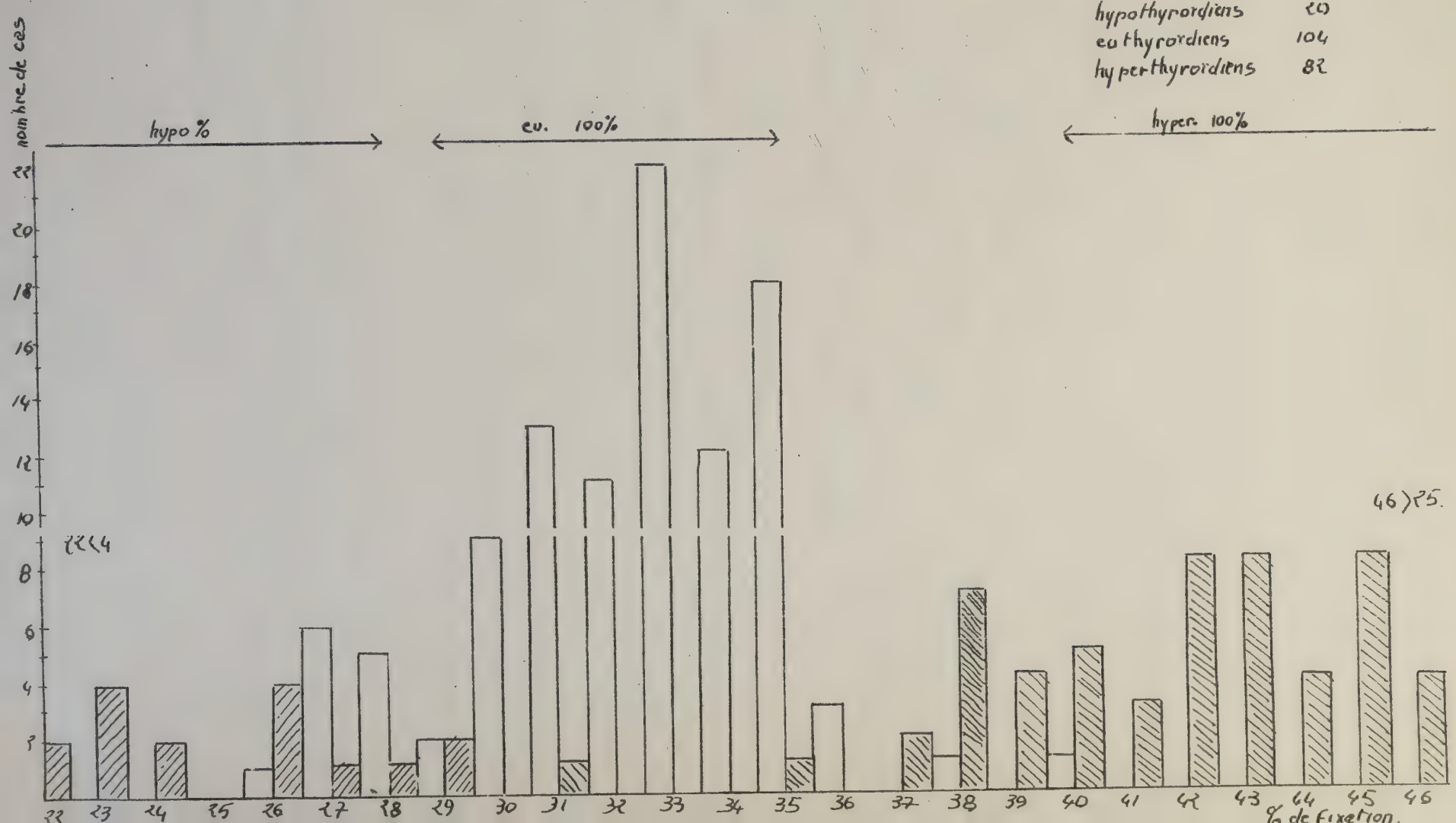
Dans ces conditions, sur 104 cas, nous avons trouvé :

- 84 cas dans la zone euthyroïdienne
- 8 cas dans la zone incertaine
- 12 cas dans la zone hypothyroïdienne

TEST TRIOSORB

(Figure n° 5)

nombre de cas	296
hypothyroïdiens	20
eu thyroïdiens	104
hyperthyroïdiens	82



Sujets Hyperthyroïdiens

La moyenne du taux de fixation de T_3^* est de 45,7 % $\pm$ 5,5 %
On peut considérer la zone à partir de 40, 5 % et au delà comme étant une zone d'hyperthyroïdie avec une probabilité de 100 %.

Sur 82 cas, nous avons trouvé :

- 67 cas dans la zone hyperthyroïdie
- 14 cas dans la zone incertaine.
- 1 cas dans la zone euthyroïdie.

Par ailleurs, nous avons constaté que les cas recensés dans ces zones incertaines étaient en accord avec la clinique.

Nous résumons nos résultats dans le Tableau n° 4..

L'examen du Tableau n° 4 montre que le test TRIOSORB présente une résolution moyenne pour la séparation des malades en trois groupes (10 % d'incertitude pour les hypothyroïdiens, 11, 6 % pour les euthyroïdiens, et seulement 1,2 % pour les hyperthyroïdiens.)

Certains auteurs trouvent la zone euthyroïdienne comprise entre 25 et 35 % avec une valeur moyenne de 30 % (44 - 48). Nos résultats font apparaître une zone euthyroïdienne un peu plus étroite entre 28 et 36 %.

Par ailleurs, les zones hypothyroïdienne et euthyroïdienne chevauchent pour les valeurs comprises entre 26 et 28 %.

En effet, dans cet intervalle, nous trouvons 6 hypothyroïdiens et 13 euthyroïdiens.

	Nombre de cas.	Moyenne %	Ecart-type %	En accord avec la clinique avec une probabilité de 100 %	% de cas compris dans la zone incertaine	% de cas en desaccord avec la clinique
Hypothyroïdiens	20	23,8	± 3,8	85 %	5 %	10 %
Euthyroïdiens	104	32	± 2,64	81,7 %	6,7 %	11,6 %
Hyperthyroïdiens	82	45,7	± 5,5	81,7 %	17,1 %	1,2 %

TABLEAU N° 4

De même pour les valeurs plus élevées, on constate un nouveau chevauchement entre 36 et 39 %.

D'après nos résultats, nous pensons que la zone hyperthyroïdienne peut être valablement étendue jusqu'à 37 %.

La définition très moyenne constatée pour la zone euthyroïdienne est partiellement due au fait que les protéines porteuses peuvent subir des modifications le plus souvent dans leur concentration, plus rarement qualitativement. Dans ces conditions, le test donnera un classement erroné.

C'est pourquoi nous pensons que le test TRIOSORB ne peut pas être complètement valable, lorsqu'il est effectué seul. Par contre, il se révèlera très précieux, comme nous le verrons plus loin, lorsqu'il est effectué conjointement avec une détermination de la thyroxine totale plasmatique (TETRASORB).

En conclusion , le test TRIOSORB donnera des résultats valables (100 % de probabilité), lorsque les valeurs trouvées seront dans des limites nettement définies.(Nos résultats conduisant à des valeurs légèrement plus élevées que celles trouvées dans d'autres laboratoires). Tenant compte de ces limites :

- les valeurs inférieures à 27 % correspondront vraisemblablement à la zone hypothyroïdienne.
- les valeurs comprises entre 29 et 35 % à la zone euthyroïdienne.
- les valeurs supérieures à 37 % à la zone hyperthyroïdienne.

Par contre, une incertitude plane sur la validité de la détermination lorsque les valeurs sont comprises dans les zones incertaines préalablement définies (27 - 29 % et 35 - 37 %).

Enfin et surtout, si le sujet est atteint d'une anomalie au niveau des protéines porteuses, le test est perturbé et ses résultats, bien souvent, sont difficilement interprétables.

* *
*

- Test "TETRASORB"

Nous avons effectué le test TETRASORB sur 201 cas. Ces cas ont été classés en trois catégories :

- Hypothyroïdiens (28 cas)
- Euthyroïdiens (120 cas)
- Hyperthyroïdiens (53 cas).

Ce classement a été confirmé par le diagnostic clinique et par les tests dynamiques avec l'Iode 131. Comme pour le test TRIOSORB, notre échantillonnage a été pratiquement semblable ; 80 % des sujets euthyroïdiens étaient bien portants et 20 % souffraient de troubles organiques mineurs d'origine extra-thyroïdienne. Aucun de ces patients n'avaient reçu un traitement avant que nous ayons effectué l'analyse. Enfin, aucun cas n'a été éliminé.

Les résultats sont exprimés en µg d'Iode/100 ml de sérum. Nos déterminations sont comprises entre 1 et 20 µg/100 ml.

Sujets Hypothyroïdiens.

Sur 28 cas, nous avons trouvé une moyenne de 2,72 µg/100 ml ; l'écart-type étant de $\pm$ 0,73

Nous considérons donc que les valeurs inférieures à 3,45 µg/100 ml correspondent à des sujets hypothyroïdiens avec une probabilité de 100 %.

Ces 28 cas effectués sont tous inclus dans cette zone. Aussi cet ensemble de résultats correspond à un accord 100 % avec la clinique.

Sujets Euthyroïdiens

Sur 120 cas, nous avons trouvé une moyenne de 5,2 µg/100 ml $\pm$ 0,99.

La zone comprise entre 4,21 - 6,19 µg/100 ml correspond donc à des sujets euthyroïdiens avec une probabilité de 100 %.

Nous devons signaler qu'il existe une zone incertaine comprise entre 3,45 et 4,21 µg/100 ml. Comme nous avons établi notre graphique en portant en abscisses 1 µg/unité de longueur, cette zone n'apparait plus.

En effet, les valeurs comprises entre 3,00 et 3,99 µg/100 ml sont considérées comme hypothyroïdiennes et les valeurs comprises entre 4,00 et 4,99 µg/100 ml comme euthyroïdienne.

Il en est ainsi également pour les zones de chevauchement, eu et hyperthyroïdienne.

En conséquence, nous avons recensé :

- 109 cas dans la zone euthyroïdie
- 6 cas dans la zone hypothyroïdie
- 5 cas dans la zone hyperthyroïdie.

Sujets Hyperthyroïdiens

Sur 53 cas, la moyenne des résultats est 9,5 µg/100 ml, l'écart-type étant de $\pm$ 1,79

Ainsi, les valeurs supérieures à 7,71 µg/100 ml correspondent à des sujets hyperthyroïdiens avec une probabilité de 100 %. Vu le choix de nos unités, (en abscisses), nous considérons que la zone peut être étendue jusqu'à 7,00 µg/100 ml.

Nous trouvons ainsi :

- 48 cas dans la zone hyperthyroïdie
- 5 cas dans la zone euthyroïdie (uniformément répartis).

(Tableau n° 5).

En raison du choix de nos unités en abscisses, nous éliminons les zones incertaines, et par conséquent, diminuons la probabilité des valeurs aux limites. Malgré ce léger facteur d'incertitude, le test TETRASORB semble donner une bien meilleur résolution pour les cas d'hypothyroïdie.

Les cas euthyroïdiens semblent moins s'étaler vers les valeurs extrêmes. En effet, nous avons trouvé 90,8 % de sujets en accord avec la clinique. Pour les hyperthyroïdiens, on recense également 92,4 % des cas en accord avec la clinique.

En résumé, nous considérons que :

- les valeurs inférieures à 4 µg/100 ml correspondent à des hypothyroïdies.
- les valeurs comprises entre 4 et 6 µg/100 ml correspondent à des euthyroïdies.
- les valeurs supérieures à 7 µg/100 ml correspondent à des hyperthyroïdies. (Fig. N° 6)

Toutefois, nous devons considérer avec une certaine réserve les résultats voisins de 4 µg/100 ml et 7 µg/100 ml.

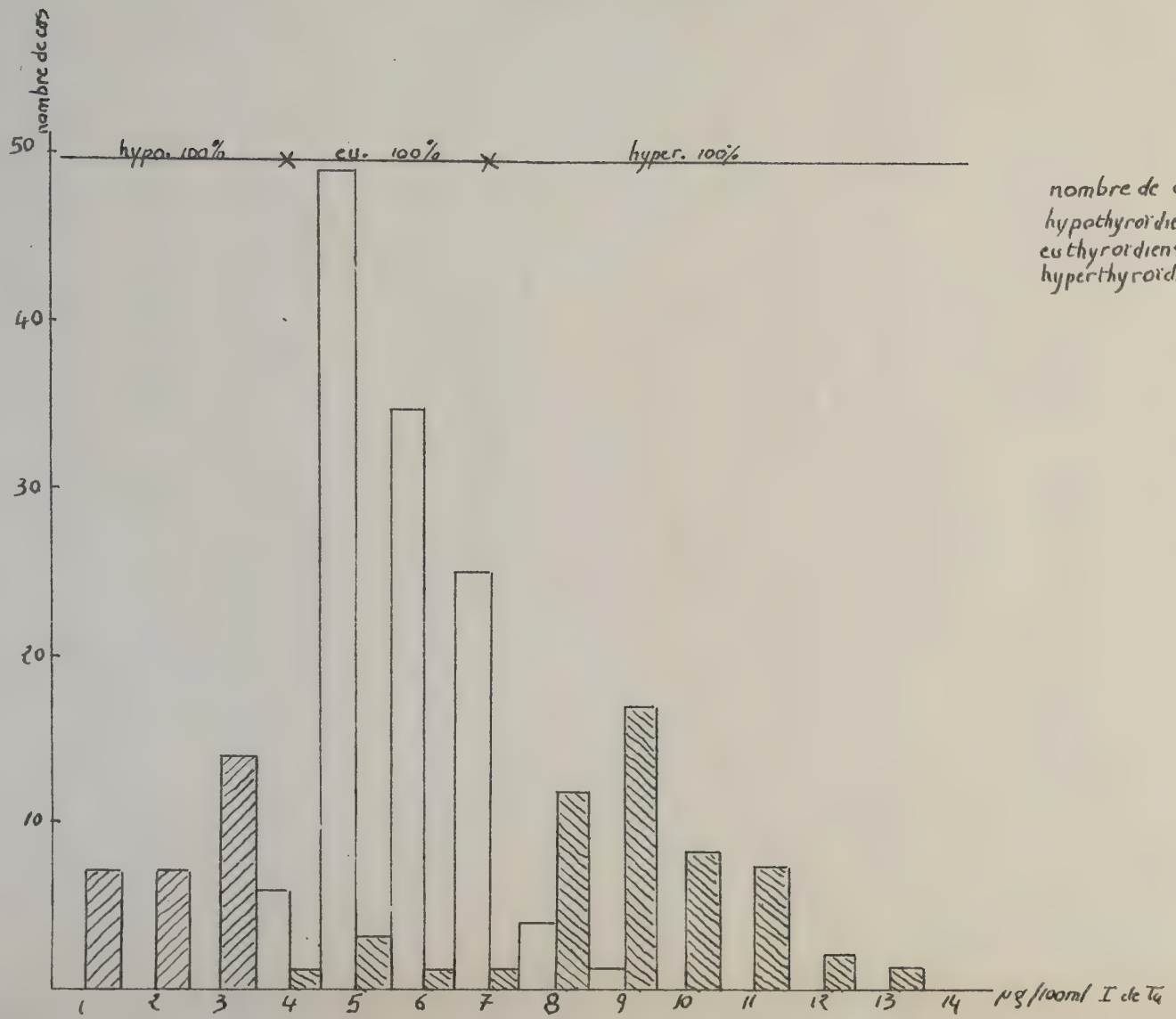
* *
*

	Nombre de cas.	Moyenne en µg/100 ml en Iode.	Ecart-type	% en accord avec la clinique	% en desaccord avec la clinique
Hypothyroïdiens	28	2,72	± 0,73	100 %	0 %
Euthyroïdiens	120	5,2	± 0,99	90,8 %	9,2 %
Hyperthyroïdiens	53	9,5	± 1,79	92,4 %	7,6 %

TABLEAU N° 5

TEST TETRASORB

(Figure n° 6)



nombre de cas	201
hypothyroïdiens	28
euthyroïdiens	120
hyperthyroïdiens	53

- FACTEUR DE THYROXINE LIBRE

Nous avons calculé ce facteur de thyroxine libre*, sur 130 cas, ce qui implique que sur ces 130 cas, nous avons effectué conjointement - le test TRIOSORB (détermination des sites libres de la T.B.G.), et le test TETRASORB (détermination de la thyroxine totale sérique).

Voici les résultats obtenus :

Sujets Hypothyroïdiens.

Sur 20 cas, la moyenne trouvée pour le facteur de thyroxine libre est de $2,03 \pm 0,65$.

Nous obtenons donc une zone dont les valeurs inférieures à 2,68 correspondent à des sujets hypothyroïdiens avec une probabilité de 100 %. Nous avons étendu cette zone jusqu'à la valeur 3,00, puisque notre unité de longueur en abscisses = 1. Ainsi nos 20 cas sont inclus dans cette zone.

Sujets Euthyroïdiens

Pour 63 cas, la moyenne est de 5,23 avec un écart-type de $\pm 1,10$.

La zone comprise entre 4,13 et 6,30 correspond à des sujets euthyroïdiens avec une probabilité de 100 %. Comme précédemment, nous

---

* ce facteur est exprimé en unités arbitraires.

avons étendu cette zone entre 4, 00 et 7, 00.

Cette zone est adjacente à deux zones incertaines : une zone côté hypothyroïdie, comprise entre 3, 00 - 4, 00 ; et une zone côté hyperthyroïdie, comprise entre 7, 00 - 9, 00. Nous avons recensé ainsi :

- 53 cas dans la zone euthyroïdie
- 10 cas dans la zone incertaine.

Sujets Hyperthyroïdiens

Sur 47 cas, la moyenne du F. T. L. est de 13, 13 $\pm$ 3, 35.

Ainsi les valeurs supérieures à 9, 68 correspondent à des sujets hyperthyroïdiens avec une probabilité de 100 %. Nous avons fait commencer cette zone à partir de 9, 00. (pour les mêmes raisons que précédemment).

On trouve alors :

- 43 cas dans la zone hyperthyroïdienne
- 2 cas dans la zone incertaine.
- 2 cas dans la zone euthyroïdienne.

Nos résultats sont résumés dans le tableau n° 6.

Ce facteur utilisant conjointement les deux tests (TRIOSORB et TETRASORB) semble donner une meilleure séparation des cas : les hypothyroïdiens étant nettement séparés des euthyroïens.

Alors que pour les deux tests envisagés séparément, les euthyroïdiens présentaient une zone de chevauchement avec les hyper et les hypo. Le facteur de thyroxine libre conduit à une zone beaucoup plus

	Nombre de cas.	Moyenne	Ecart-type	En accord avec la clinique avec 100 % de probabilité.	% compris dans la zone incertaine	% en désaccord avec la clinique
Hypothyroïdiens	20	2,03	$\pm$ 0,65	100 %	0 %	0 %
Euthyroïdiens	63	5,23	$\pm$ 1,10	84,2 %	15,8 %	0 %
Hyperthyroïdiens	47	93,13	$\pm$ 3,35	91,5 %	4,25 %	4,25 %

TABLEAU N° 6

FACTEUR DE THYROXINE LIBRE

nombre de cas	130
hypothyroïdiens	20
euthyroïdiens	63
hyperthyroïdiens	47

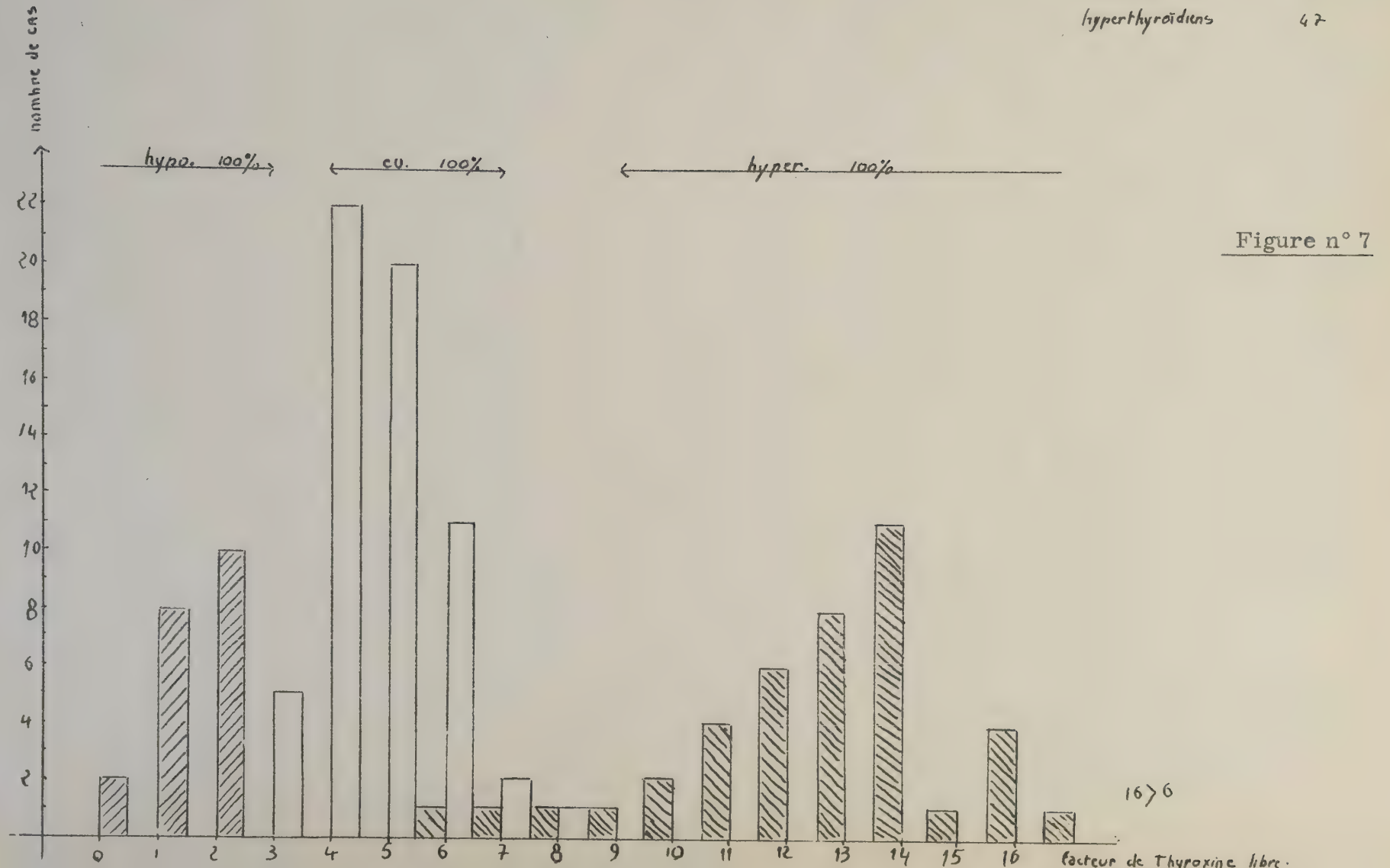


Figure n° 7

étroite avec un net maximum pour les valeurs comprises entre 4 et 5.

Il en est de même pour les hyperthyroïdiens chez lesquels on n'observe pas de maximum net, mais un étalement progressif jusqu'aux valeurs 13 - 14. Pourtant nous devons noter deux cas qui se trouvent dans la zone euthyroïdie, ce qui correspond à 4,25 % d'incertitude.

Comparé avec le TETRASORB où nous avons, dans les mêmes conditions, 7,25 % d'incertitude, il semble bien évident que le facteur de thyroxine libre conduit à une excellente séparation des groupes.

Cas Particuliers

Le Facteur de Thyroxine Libre (F.T.L.) est d'un grand intérêt dans les cas où il y a discordance, plus ou moins évidente entre les résultats du test TRIOSORB et du test TETRASORB. Nous avons donc étudié 22 cas (patients euthyroïdiens) qui présentaient une anomalie quelconque au niveau de leurs protéines porteuses, (appartenant à diverses catégories : femme enceinte, retard psychomoteur, puberté précoce, retard staturo-pondéral, affections hépatiques etc... Nos résultats sont rassemblés dans le Tableau n° 7.

Si l'on interprète les résultats des deux premières colonnes (du tableau n° 7) en fonction des normes préalablement établies, on constate pour chacun des cas et ceci de façon uniforme, qu'il y a discordance entre le test TRIOSORB et le test TETRASORB, leur évolution s'effectuant de façon opposée. Lorsque le test TRIOSORB prend des valeurs basses, le test TETRASORB atteint des valeurs élevées. Ce phénomène est très net dans 12 cas. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse de RALL (45) concernant la thyroxine libre ; lorsqu'il existe une anomalie au niveau des protéines porteuses, il se produit une variation de la concentration de thyroxine dans le plasma afin de maintenir constant le taux de thyroxine libre (objectivé par le F.T.L.)

Par exemple, s'il y a élévation de la concentration en protéines porteuses, (TRIOSORB abaissé), la capacité latente de fixation de la thyroxine vis à vis des protéines porteuses augmente ; par voie de conséquence immédiate, on assiste à une baisse de la thyroxine libre, qui va à son tour entraîner, comme nous l'avons déjà vu, une augmentation de la sécrétion de T.S.H., et donc une augmentation de la production par la

TABLEAU N° 7

cas	T_3 en % de fixation sur résine	T_4 μg ^{127}I/100 ml	F.T.L. en unités arbitraires;
	38,4	3,13	3,75
	36,5	3,46	3,94
	46,4	3,13	4,53
	22,7	6,66	4,72
	28,2	9,44	8,28
	36,2	3,19	3,60
	24,1	5,94	4,47
	38,8	3,13	3,79
	37,8	3,46	4,08
	28,6	9,07	8,09
	41	3,91	5,00
	21,1	7,57	4,98
	30,2	2,48	2,33
	32,9	3,33	3,42
	22,3	6,59	4,56
	35,8	2,80	3,13
	16,4	7,11	3,64
	22,7	6,66	4,72
	17,7	4,89	2,70
	48,4	2,48	3,74
	38,7	3,78	4,57
	46,4	3,13	4,53

hormonale par la glande, ceci jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre s'établisse. (Cf : Figure n° 8).

Nous avons confirmé expérimentalement ces données en calculant le facteur de thyroxine libre sur ces 22 cas.

Nous avons ainsi obtenu :

- 10 cas dans la zone euthyroïdie avec une probabilité de 100 %.
- 10 cas dans la zone incertaine dont, 7 cas entre 3,00 et 4,00 pouvant être considérés comme euthyroïdiens.

et seulement - 2 cas dans la zone hypothyroïdie.

Il apparaît donc nettement que le facteur de thyroxine libre améliore considérablement les possibilités de diagnostic de la fonction thyroïdienne, et ceci dans les cas où les tests TRIOSORB et TETRASORB sont discordants.

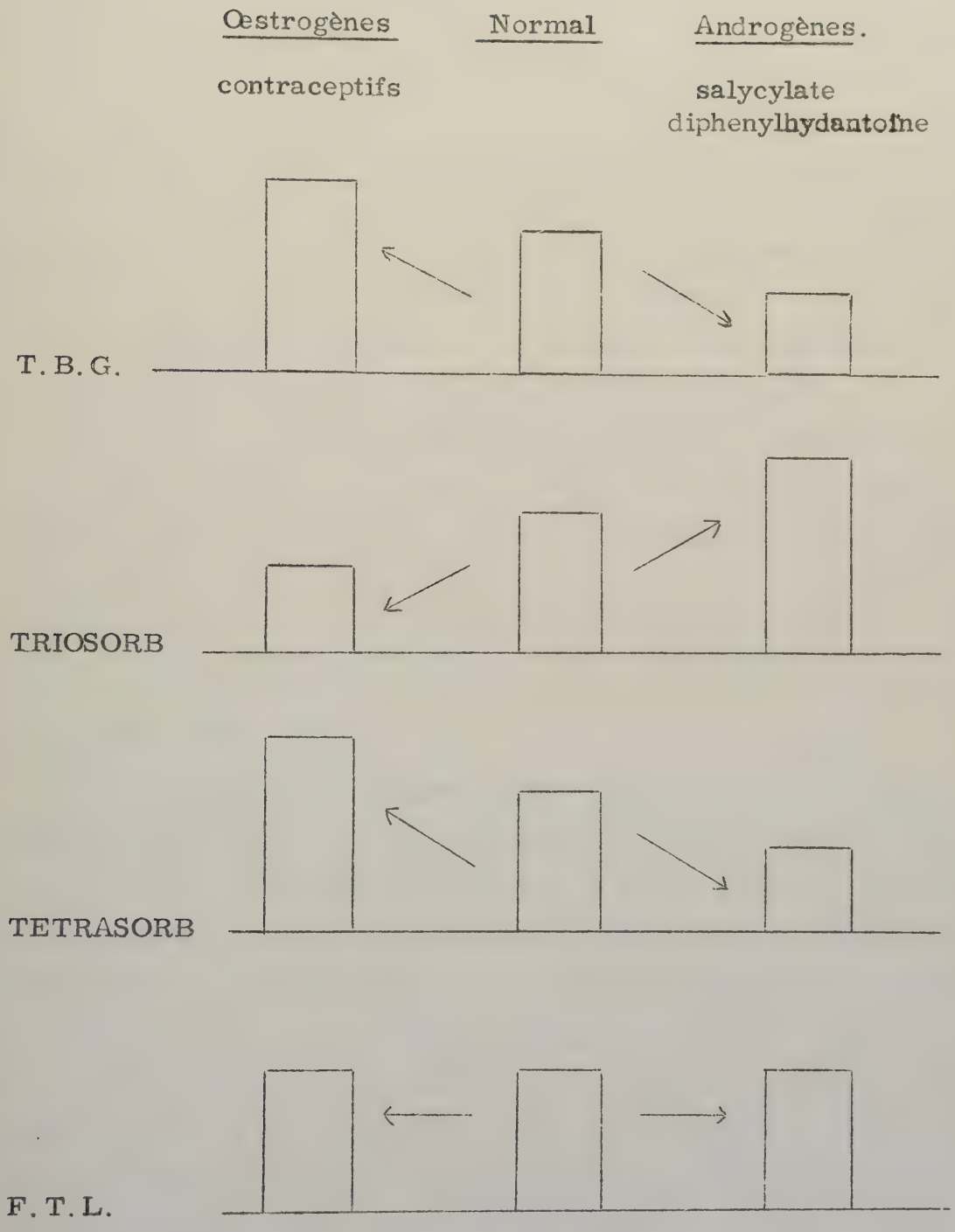

Œstrogènes
Normal
Androgènes.
contraceptifs
salycylate
diphenylhydantoïne
T. B. G.
TRIOSORB
TETRASORB
F. T. L.

Figure n° 8

DISCUSSION

Nous venons d'exposer un certain nombre de résultats concernant les deux méthodes TRIOSORB et TETRASORB. La tentation est grande d'effectuer une comparaison entre ces deux techniques. Cependant il est nécessaire de ne pas considérer ces deux méthodes sur un plan égal, en leur demandant de donner des réponses diagnostiques similaires, car ces deux méthodes ne testent pas des fonctions semblables, et il serait illusoire par exemple de faire le diagnostic d'une hyperthyroïdie sur la seule valeur du "TRIOSORB". Par ailleurs, il serait également imprudent d'apprécier une hyperthyroïdie sur la seule valeur du "TETRASORB, qui toutefois parait souvent mieux coincider avec l'état clinique du sujet.

Certainement la thyroxinémie exprimée en valeur absolue (μg/100 ml) est une constante de choix puisqu'elle donne des résultats équivalents ou meilleurs que ceux fournis naguère par le P.B.I ou le B.E.I. Mais, comme nous l'avons vu, il est essentiel de considérer que la thyroxinémie n'est pas le seul élément important puisque la thyroxine qui doit nécessairement agir au niveau des tissus a besoin d'emprunter un moyen de transport ; ce moyen lui étant fourni par les protéines, au premier rang desquelles il faut placer les globulines. Par conséquent, deux facteurs "asserrés" l'un à l'autre d'une manière plus ou moins lâche vont concourir à matérialiser l'état biologique thyroïdien, tel qu'il pourra être reflété par l'examen plasmatique.: la quantité de thyroxine circulante

d'une part "TETRASORB" et la concentration, et également l'état de saturation dans lequel se trouvent les protéines porteuses (TRIOSORB). Il est bien évident que l'on parle de deux entités bien différentes. Si l'on se refère donc aux diagrammes n° 5 et 6, il apparait que les deux tests "TRIOSORB" et "TETRASORB" permettent imparfaitement de séparer les sujets examinés en trois catégories assez nettement distinctes.

Si l'on se refère au diagramme concernant le test TRIOSORB, on peut constater (comme c'est d'ailleurs le cas pour le P.B.I. et B.E.I test résines etc..), que les chevauchements entre hyperthyroïdien et euthyroïdien sont assez minime, mais que par contre, la frontière entre euthyroïdien et hypothyroïdien est bien imprécise.

En ce qui concerne le dosage TETRASORB, les limites sont beaucoup mieux précisées, et la frontière entre hypothyroïdien et euthyroïdien semble plus nette. Cependant, en ce qui concerne la différenciation hyperthyroïdie et euthyroïdie, il existe quelque empiétement .(Il est indispensable toutefois de préciser que les histogrammes présentés sont des histogrammes 100 %).

On pourrait certes se contenter de cette appréciation simultanée : "TRIOSORB -TETRASORB". Le TRIOSORB permettant un diagnostic d'orientation, le TETRASORB venant apporter une précision supplémentaire chiffrée; et en toute exactitude, c'est la conception que nous avions, il y a encore peu de temps, à savoir que le TRIOSORB nous permettait de trier les malades et le TETRASORB de chiffrer en quelque sorte l'intensité de leur maladie. Mais, il nous est apparu assez rapidement qu'en réalité, en allant au fond des choses, ces deux examens fai-

saient le bilan de deux fonctions bien différentes : l'une la capacité de fixation des protéines porteuses et l'autre la quantité de thyroxine circulante. Les résultats de ces deux tests sont certainement reliés entre eux mais par des relations qui ne sont pas simples et surtout pas constantes. C'est ce que nous pensons avoir montré précédemment chez des sujets par exemple, pour lesquels la concentration de protéines porteuses augmentait et cependant présentaient un état thyroïdien normal. Il fallait donc, dans ces conditions, que la quantité de thyroxine circulante trouvée augmente. C'est ce que nous avons rencontré dans le cas de la femme enceinte.

Cette augmentation de la concentration des protéines porteuses est provoquée par les œstrogènes et la concentration de thyroxine circulante, va par voie de conséquence, s'adapter à cet état. Par ailleurs, dans le cas d'augmentation de la concentration plasmatique d'androgènes des phénomènes inverses vont être constatés.

C'est pourquoi nous attachons la plus grande valeur au facteur de thyroxine libre, tel que nous l'avons défini précédemment. Car ce facteur tient compte à la fois de l'état des protéines porteuses (TRIOSORB) et de la quantité de thyroxine circulante (TETRASORB). Il met en évidence une constante biologique qui pour de nombreux auteurs semble être proportionnelle à l'action de l'hormone au niveau des cellules, puisqu'on s'accorde généralement à reconnaître que seule la thyroxine libre, c'est-à-dire dégagée de son support protéique, peut agir au niveau cellulaire.

Le diagramme que nous présentons concernant ce facteur de thyroxine libre (F.T.L.) (n° 7) ne montre pas pour une probabilité de 100 % un empiétement majeur entre les trois catégories : hypo, eu et hyperthyroïdien ; c'est pourquoi, nous sommes tentés de leur accorder sur le plan biologique une grande valeur.

Evidemment, ces conceptions pourront se confirmer lorsque nous serons en présence d'un beaucoup plus grand nombre de cas, mais dès maintenant, il nous est apparu que le facteur de thyroxine libre coïncidait avec la clinique dans plus de 95 % des cas, et que dans ces conditions, on était autorisé à recommander, systématiquement, aux Cliniciens, d'effectuer un dosage simultané "TRIOSORB - TETRASORB", qui seul dans l'état actuel peut conduire à la détermination d'un facteur de thyroxine libre (F.T.L.) de grande valeur.

CONCLUSIONS

1°) - Les hormones thyroïdiennes depuis leur source jusqu'à leur lieu d'utilisation ne cheminent pas seules, mais associées dans le plasma à des protéines porteuses : Préalbumine (T.B.P.A.), globuline (T.B.G.) ou Albumine (T.B.A.). Les caractéristiques de ces protéines ont été brièvement rapportées.

2°) - Les méthodes permettant d'évaluer la capacité de fixation des hormones thyroïdiennes pour ces protéines et de déterminer la concentration de thyroxine plasmatique sont exposées.

Elles font appel à l'utilisation d'isotopes radioactifs "in vitro" (T_3^* ou T_4^* marquée au moyen de ^{131}I ou de ^{125}I) "TRIOSORB et TETRASORB.

3°) Les résultats les concernant sont exposés (550 cas environ). L'intérêt de chacune de ces déterminations est discuté.

4°) En conclusion, on peut dire qu'il est indispensable d'effectuer les deux tests simultanément, car seule leur association permet de calculer un "Facteur de Thyroxine Libre), considéré à l'heure actuelle comme un fidèle index du fonctionnement thyroïdien.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALBRIGHT (E.C.)- LARSON (F.C.) et DEISS (W.P.) - J. Clin. Endocr. 1956, 16, 149

2 - BLANQUET (P.) - DUCASSOU (D.) - TUBY (M.) - BECK (C.) et FOMBELLIDA (J.).
"Mesure de l'hormonémie thyroïdienne au moyen d'un nouveau test in vitro". - Bordeaux Médical, 1969, 10, 1971.

3 - BELLABARBA (D.)- INADA (M.) - VARSANHO-ABARON (N.) et STERLING (K.)
"Thyroxine transport and turn over in major nonthyroïdal illness". J. Clin. Endocr. - 1968, 28, 1023.

4 - CHRISTENSEN (L.K.)
"A method for the determination of free non-protein bound thyroxine in serum". - Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1959, 11 326.

5 - CLARK (F.)
"Resin uptake of ^{131}I triiodothyronine : an in vitro test of thyroid function. - Lancet - 1963, 2, 167.

6 - CLARK (F.) et HORN (D.B.)
"Assessment of thyroid function by the combined use of the serum protein bound iodine and resin uptake of ^{131}I triiodothyronine". - J. Clin. Endocr. - 1965, 25, 39.

7 - CUARON (A.) - J. Clin. Endocr. - 1966, 26, 53.

8 - DEISS (W.P.) - ALBRIGHT (E.C.) et LARSON (F.C.)
"Comparison of in vitro serum protein binding of thyroxine and triiodothyronine". - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1953, 84, 513.

9 - DOWLING (J.T.) - FREINKEL (N.) et INGBAR (S.N.)
"Effect of diethylstilbestrol on the binding of thyroxine in serum" J. Clin. Endocr. - 1956, 16, 149.

10 - EKINS (R.P.)
"The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique". - Clin. Chim. Acta. - 1960, 5, 453.

11 - GARNETT (E.S.) - POLLARD (A.C.) et WEBBER (C.E.)
"Clinical usefulness of an automatic ^{131}I triiodothyronine uptake test". - Lancet - 1965, 11, 318.

12 - GOOD (B.F.) - POTTER (H.A.) et HETZEL (B.S.)
"The effect of salicylates and related drugs on thyroxine binding in man". - Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. - 1965, 43, 291.

13 - GOOLDEN (A.W.G.) - GARTSIDE (J.M.) et OSORIO (C.) - J. CLin. Endocr. - 1965, 25, 127.

14 - GOOLDEN (A.W.G.) - GARTSIDE (J.M.) et SANDERSON (C.)
"Thyroid status in pregnancy and in women taking oral contraceptives. - Lancet, - 1967, 1, 12.

15 - GORDON (A.H.) - GROSS (J.) - O'CONNOR (D.) and PITT-RIVERS (R.) - Nature - London - 1952, 169, 19.

16 - HAMOLSKY (M.W.) - ELLISON (H.E.) et FREEDBERG (A.S.)
J. Clin. Invest. - 1957, 36, 1486.

17 - HAMOLSKY (M.W.) - STEIN (M.) et FREEDBERG (A.S.)
"The thyroid hormone plasma protein complex in man. II. A new in vitro method for study of "uptake" of labelled hormonal components by human erytrocytes". J. Clin. Endocr. - 1957, 17, 33.

18 - HAMOLSKY (M.W.) - GOLODETZ (A.) et FREEDBERG (A.S.)
"The plasma protein thyroid hormone complex in Man III further studies on the use of the in vitro red blood cell uptake of ^{131}I triiodothyronine as a diagnostic test of thyroid function. J. Clin. Endocr. - 1959, 19, 103.

19 - HAMOLSKY (M.W.) - FISCHER (D.B.) et FREEDBERG (A.S.)
Endocrinology - 1960, 66, 780.

20 - HOCH (F.L.) - Physiol. Rev. - 1962, 42, 605.

21 - INGBAR (S.H.) et FREINKEL (N.) -
"Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones
Recent Prog hormone Res. - 1960. - 16, 383.

22 - INGBAR (S.H.) - WATERHOUSE (C.) et CUSHMANN (P.)
"Observation on the nature of the underlying disorder and the occurence of associated plasma transport abnormalities in a patient with an idiopathic increase in the plasma thyroxine-binding globulin". - J. Clin. Invest. - 1964, 42, 2266.

23 - INGBAR (S.H.) - BRAVERMAN (L.E.) - DAWBER (N.A.) et LEE (G.Y.)
"A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration". - J. Clin. Invest. - 1965, 44, 1679.

24 - KAPLAN (B.C.)
"A simple method for the determination of serum thyroxine, a talk presented before the Bioanalysis section". - American Association for the advancement of Sciences - 133rd Meeting Dec. 28, 1966.

25 - KENNEDY (J.A.) et ABELSON (D.M.)
"Determination of serum thyroxine using a resin sponge technique". - J. Clin. Path. - 1967, 20, 89.

26 - LEMARCHAND - BERAUD (T.H.) et VANNOTTI (A.)
"Transport des hormones thyroïdiennes en pathologie humaine" Rev. Europ. Endocr. - 1964, 1, 221.

27 - LIEWENDAHL (K.) et LAMBERG (B.A.) - J. Clin. Endocr. - 1965, 25, 991.

28 - LIEWENDAHL (K.) et LAMBERG (B.A.) - Acta endocr. (Kbh) - 1969, 61, 343.

29 - MITCHELL (M.L.) - HARDEN (A.B.) et O'ROURKE (M.E.)
"The in vitro resin sponge uptake of triiodothyronine ^{131}I from serum in thyroid disease and in pregnancy".- J. Clin. Endocr. - 1960, 20, 1474.

30 - MURPHY (B.E.P.) et PATTEE (G.T.)
"Détermination of thyroxine utilizing the property of protein binding". - J. Clin. Endocr. Metab. - 1964, 24, 187.

31 - MURPHY (B.E.P.) et JACHAN (C.)
"The determination of thyroxine by competitive protein binding analysis employing an anion-exchange resin and radiothyroxine J. Lab. Clin. Med. - 1965, 66, 161.

32 - NAKAJIMA (H.) - KURAMOCHI (M.) HORIGUCHI (T.) et KUBO (S.)
"A new and simple method for the determination fo thyroxine in serum". J. Clin. Endocr. Metab. - 1966, 26, 99.

33 - NEWLON TAUXE(M.D.) et TSUNESUKE KUSAKABE (M.D.)
"Radioisotopes in medicine in vitro studies A.E.C. Juin 1968, 273.

34 - OPPENHEIMER (J.H.) SQUEF (R.) - SURKS (M.I.) et HAUER (H.)
"Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrum dialysis and electrophoretic technique. Alteration in non thyroidal illness."- J. Clin. Invest. - 1963, 42, 1769.

35 - OSORIO (C.) - JACKSON (O.J.) - GARTSIDE (J.M.) et GOOLDEN (A.W.G.)
"The uptake of ^{131}I triiodothyronine by red cells in relation to the binding of thyroid hormones by plasma protéins." - Clin. Sci. - 1961, 21, 355.

36 - OSORIO (C.) - JACKSON (D.J.) - GARTSIDE (J.M.) et GOOLDEN (A.W.G.) -
"The assessment of free thyroxine in plasma". - Clin. Sci. 1962, 23, 525.

37 - PETERMANN (M.L.) - ROBBINS (J.) et HAMILTON (M.G.) - J. Biol. Chem. - 1954, 208, 369.

38 - RALL (J.E.) - ROBBINS(J.) et LERNER (C.G.)
"The hormones"by G. PINCUS (K.V.) - THIMANN et E.B. ASTWOOD - Vol. V. - P. 159-439. - New-York Academic Press 1964.

39 - RALL (J.E.) - ROBBINS and LEWELLEN
"The thyroid in the hormones" by G. PINCUS (K.V.) THIMANN et ASTWOOD (E.B.) - Acad. Press. - 1954, 5, 159.

40 - RALL (J.E.)
"Gamma Symp on Endocr". - 1966, 3, 137.

41 - REICHLIN (S.) et UTIGER (R.D.) - Regulation of the pituitary thyroid axis in man : relationship of TSH concentration to con-
c centration of free and total thyroxine plasma". - J. Clin. Endocr 1967, 27, 51.

42 - ROBBINS (J.) - PETERMANN (M.I.) et RALL (J.E.) - J. Biol. Chem. 1955, 210, 403.

43 - ROBBINS (J.) et RALL (J.E.) - Recent progr. Hormone Res. - 1957, 13, 161.

44 - ROBBINS (L.R.)
"Experience with the in vitro erythrocyte uptake of ^{131}I labelled triiodothyronine in a routine clinical laboratory". J. Clin. Endocrinol. - 1959, 19, 1292.

45 - ROBBINS (J.) et RALL (J.E.)
"Proteins associated with the thyroid hormones" - Physiol. Rev. U.S.A. - 1960, 40, 415.

46 - ROCHE (J.) - ANDREOLI (M.) et SALVATORE (G.)
"Interaction : hormones thyroïdiennes protéines plasmatiques et tansport sanguin des hormones" - Ann. Biol. Clin. - 1967, 5 - 6, 599.

47 - SHAPIRO (B.) et RABINOWITZ (J.L.) - J. Nucl. Med. - 1962, 3, 456.

48 - SCHUMACHER (O.P.) et KING (J.W.)
"Thyroid function mesured by in vitro erythrocyte uptake (red cell uptake) of ^{131}I labeled triiodothyronine : results of 1333 determination Cleverland Clin Quart - 1960, 27, 28.

49 - STERLING (K.) et TABACHNICK (M.)
"Resin uptake of ^{131}I triiodothyronine as test of thyroid function" J. Clin. Endocr. - 1961, 21, 456.

50 - STERLING (K.) et HEGEDUS (A.)
"Measurement of free thyroxine concentration in human serum" J. Clin. Invest. - 1962, 41, 1031.

51 - STERLING (K.) - ROSEN (P.) et TABACHNICK
"Equilibrium dialysis studies of binding of thyroxine by human serum albumin". - J. Clin. Invest - 1962, 41, 1029.

52 - TRITSCH (G.L) et TRITSCH (NE).
"Thyroxine binding II - Nature of binding site of human serum albumin" - J. Biol. Chem. - 1963, 238. 138.

53 - WOEBER (K.A.) et INGBAR (S.H.)
"The contribution of thyroxine binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum as assessed by immuno adsorption"
J. Clin. Invest. - 1968, 47, 1710.

54 - WOLDRING (M.G.) - BAKKER (A.) et DOORENBER (H.) - Acta Endocr. (Kbh) - 1961, 37, 607.